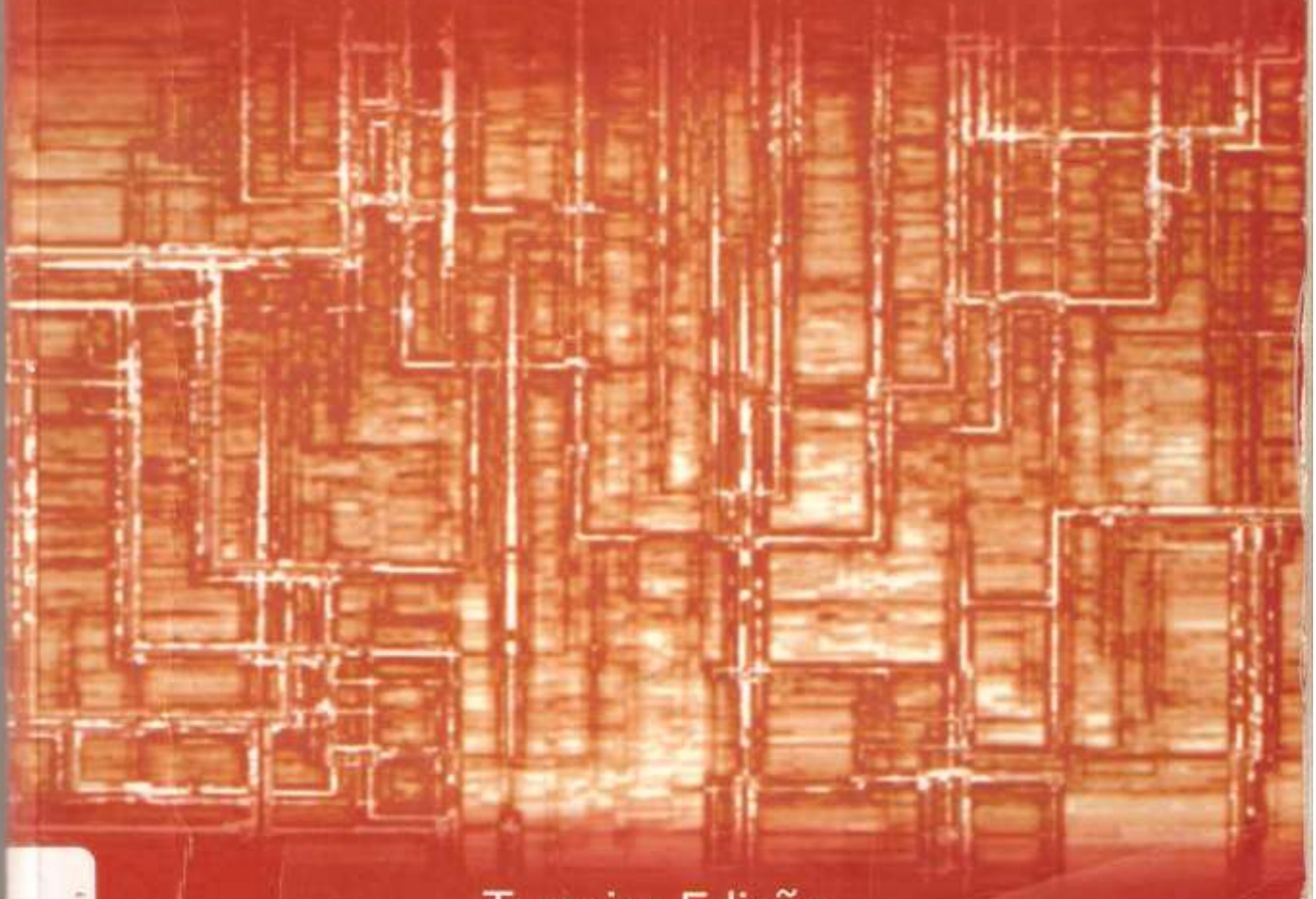
Bioquímica Básica

Anita Marzzoco
Bayardo B. Torres



Terceira Edição

gen | GUANABARA KOOGAN

CD-ROM

Conteúdo

PARTE 3 *METABOLISMO: VIAS PRINCIPAIS*

PARTE 1

CONCEITOS BÁSICOS, PROTEÍNAS E ENZIMAS

1

Sistema-Tampão

A estrutura de muitas moléculas presentes na composição celular e, por conseguinte, a grande maioria dos processos bioquímicos são extremamente sensíveis a variações de pH. Nos seres humanos, o pH plasmático deve ser mantido em torno de 7,4 em uma faixa muito estreita de variação — decréscimos a valores próximos de 7,0 têm sérias conseqüências. Intracelularmente, a restrição se repete: um exemplo suficiente da importância do pH na fisiologia celular é dado pela sua interferência na atividade das enzimas, catalisadores de todas as reações químicas celulares. Muitas destas reações processam-se com liberação ou captação de prótons do meio aquoso em que estão dissolvidas as substâncias presentes na célula. Ainda assim, o valor do pH celular ou plasmático é mantido praticamente fixo. A manutenção do pH ideal é conseguida pelos seres vivos graças à existência dos *sistemas-tampão*.

1.1 ÁCIDOS E BASES DE BRÖNSTED

Para definir sistema-tampão e compreender suas propriedades, é necessário recorrer à definição de Brönsted para ácidos e bases. Brönsted definiu *ácidos* como substâncias capazes de doar prótons e *bases* como substâncias capazes de recebê-los. Segundo esta definição, são classificados como ácidos, por exemplo, HCl, H_2SO_4, $H_3C-COOH$, NH_4^+ e $H_3C-NH_3^+$, pois podem dissociar-se, liberando prótons:

$$HCl \rightarrow Cl^- + H^+$$
$$H_2SO_4 \rightarrow HSO_4^- + H^+$$
$$H_3C-COOH \rightarrow H_3C-COO^- + H^+$$
$$NH_4^+ \rightarrow NH_3 + H^+$$
$$H_3C-NH_3^+ \rightarrow H_3C-NH_2 + H^+$$

Generalizando, a equação de dissociação de um ácido (HA) é

$$HA \rightarrow A + H^+$$

O íon (Cl^-, HSO_4^- etc.) — ou a molécula (NH_3, H_3C-NH_2) — resultante da dissociação é denominado *base conjugada* do ácido, já que pode receber um próton, convertendo-se novamente no *ácido conjugado* respectivo.

Alguns ácidos, chamados *ácidos fortes*, dissociam-se totalmente quando em soluções diluídas — é o caso, por exemplo, de HCl e H_2SO_4. Outros, os chamados *ácidos fracos*, ionizam-se muito pouco. Para estes ácidos, pode-se, portanto, escrever

$$HA \rightleftharpoons A + H^+$$

Os ácidos fracos são caracterizados por sua constante de dissociação

A equação anterior indica que, em solução aquosa, o ácido fraco HA dissocia-se, produzindo as espécies A e H que, juntamente com a parte não-dissociada, HA, compõem um equilíbrio químico. A constante de equilíbrio desta dissociação é

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]}$$

Em reações deste tipo, a constante de equilíbrio é geralmente chamada *constante de dissociação* ou de *ionização*, representada por K_a. A Tabela 1.1 apresenta alguns ácidos fracos e os valores de sua constante de dissociação; são todos ácidos fracos, mas com forças ácidas variáveis (sobre o significado de pK_a, ver Seção 1.3).

Tabela 1.1 Variação de força ácida entre os ácidos fracos

Ácido	Base conjugada	K_a	pK_a[1]
H_3PO_4	$H_2PO_4^-$	$7{,}2 \times 10^{-3}$	2,14
Lático	Lactato	$1{,}4 \times 10^{-4}$	3,86
Acético	Acetato	$1{,}7 \times 10^{-5}$	4,76
H_2CO_3	HCO_3^-	$4{,}3 \times 10^{-7}$	6,37
$H_2PO_4^-$	HPO_4^{2-}	$1{,}4 \times 10^{-7}$	6,86
NH_4^+	NH_3	$5{,}6 \times 10^{-10}$	9,25
Fenol	Fenolato	$1{,}3 \times 10^{-10}$	9,89
HPO_4^{2-}	PO_4^{3-}	$3{,}9 \times 10^{-13}$	12,40

[1]pK_a = pH em que o ácido está 50% dissociado.

1.2 SISTEMAS-TAMPÃO: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

Um sistema-tampão é constituído por um ácido fraco e sua base conjugada

Os ácidos fracos têm para a Bioquímica um interesse particular, pois, junto às suas bases conjugadas, constituem os *sistemas-tampão*, capazes de impedir grandes variações de pH quando da adição de outros ácidos ou álcalis.

Segue-se a descrição do modo pelo qual um sistema-tampão hipotético — formado pelo ácido HA e sua base conjugada A — reage à adição de um ácido forte, ou seja, à adição de prótons, já que o ácido forte dissocia-se completamente. Quando se adiciona H^+ ao equilíbrio formado pelo ácido, base conjugada e prótons ($HA \rightleftharpoons A + H^+$), o sistema-tampão reage por intermédio da base conjugada (A), que se associa a prótons, transformando-se no ácido (HA).

Dois aspectos desta associação são importantes. Primeiramente, o simples fato de haver uma associação deixará livre um número de prótons *menor* do que se a base A não estivesse presente, pois, neste caso, todos os prótons adicionados ficariam livres. Em outras palavras, o pH irá diminuir, mas muito menos do que diminuiria se a mesma quantidade de prótons fosse adicionada a uma solução desprovida da base conjugada de um ácido fraco — uma solução de NaCl, por exemplo.

Em segundo lugar, deve-se notar que o tampão constitui um equilíbrio químico, regido por uma constante de equilíbrio (K_{eq}) e, por isto, nem todos os prótons adicionados associam-se à base conjugada. Se isto ocorresse, o número de prótons em solução seria o mesmo que antes da adição; a concentração de A seria menor e a concentração de HA seria maior. Com estes novos valores para as concentrações das espécies, o valor da constante de equilíbrio seria diminuído, o que é absurdo.

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]} \neq \frac{[A]\downarrow[H^+]}{[HA]\uparrow}$$

Na realidade, embora a *maior* parte dos prótons adicionados associem-se a A, uma pequena parte fica livre, em solução. O valor final da concentração de [H^+] será, portanto, um pouco maior do que antes da adição; o de A será menor e o de HA, maior. Desta forma, o valor da constante de equilíbrio é mantido:

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]} = \frac{[A]\downarrow[H^+]\uparrow}{[HA]\uparrow}$$

Quando se adiciona um álcali ao sistema-tampão, o resultado é análogo ao caso anterior. Os íons OH^-, provenientes de um álcali como NaOH, associam-se com prótons do meio, formando H_2O.

$$OH^- + H^+ \rightleftharpoons H_2O$$

A adição do álcali corresponde, portanto, à retirada de prótons do meio. Neste caso, o equilíbrio químico que constitui o tampão reagirá por dissociação do ácido HA. Entretanto, nem todos os prótons que se associaram a OH^- serão repostos por esta dissociação — se isto ocorresse, novamente ter-se-ia uma variação no valor da constante de equilíbrio:

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]} \neq \frac{[A]\uparrow[H^+]}{[HA]\downarrow}$$

O que efetivamente ocorre é que a dissociação do ácido repõe a maior parte mas não todos os prótons que se associaram a OH^-. Haverá, portanto, uma diminuição da concentração de prótons, ou um aumento no valor do pH, muito menor, entretanto, do que aquele que ocorreria se não houvesse reposição alguma, como no caso em que a adição do álcali fosse feita à água ou a uma solução de NaCl, por exemplo.

Neste caso, a concentração final de H^+ será um pouco menor do que a inicial; a de A, maior; e a de HA, menor, mantendo o equilíbrio:

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]} = \frac{[A]\uparrow[H^+]\downarrow}{[HA]\downarrow}$$

Concluindo, dissociando o ácido quando se adiciona um álcali ou associando próton e base conjugada quando se adiciona um ácido forte, o sistema-tampão previne variações acentuadas de pH. Esta propriedade é conseqüência da existência concomitante das formas ácido e base conjugada e, embora a soma (HA + A) permaneça sempre constante, a concentração das espécies varia de acordo com o tipo — H^+ ou OH^- — e a quantidade dos íons adicionados.

1.3 FATORES QUE DETERMINAM A EFICIÊNCIA DE UM SISTEMA-TAMPÃO

A eficiência de um tampão está restrita a uma faixa de pH

A solução de um ácido fraco em água apresenta uma concentração de HA muito maior do que de A, como resultado da pequena dissociação que é característica do ácido fraco. Se esta solução for submetida a uma contínua adição de álcali, haverá uma progressiva dissociação do ácido, cuja concentração diminuirá, e um conseqüente aumento da concentração de A, acompanhados de aumento no valor de pH. Se a quantidade de álcali adicionado for grande, a concentração de HA acaba tornando-se tão reduzida que passa a ser insuficiente para compensar, com sua dissociação, novas adições de álcali. A partir deste ponto, o pH sofrerá aumentos significativos a cada nova adição de álcali, mostrando que o sistema perdeu suas propriedades de tampão. O mesmo ocorrerá quando, com constante adição de prótons, esgotar-se praticamente a espécie base conjugada — novas adições de prótons, que não encontrarão mais base conjugada à qual associar-se (e, portanto, permanecerão em solução), provocarão queda acentuada de pH. O sistema não estará mais se comportando como sistema-tampão (Fig. 1.1).

Deduz-se, do exposto, que a ação tamponante está restrita a uma faixa de pH dentro da qual as concentrações de ácido e base conjugada são suficientes para compensar adições de álcali ou de ácido. Fora do intervalo de tamponamento, como a soma (HA + A) é constante, têm-se as situações seguintes:

	[HA]	[A]
Grande adição de álcali	≅ 0%	≅ 100%
Grande adição de ácido	≅ 100%	≅ 0%

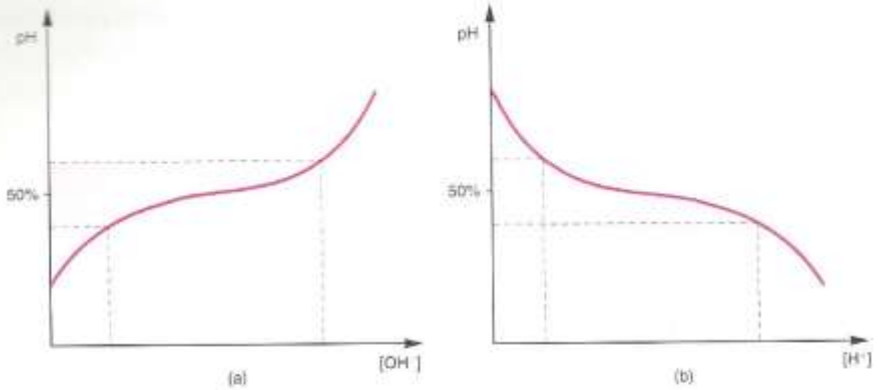


Fig. 1.1 Titulação de um ácido fraco com álcali (a) e com ácido (b). Na região assinalada, as adições de álcali ou ácido provocam pequenas variações de pH; fora desta região, a variação é grande. Nas ordenadas, está assinalado o pH em que há 50% de dissociação do ácido.

Uma outra situação apresenta interesse particular: dentro da faixa de pH onde a ação tamponante é exercida haverá, obrigatoriamente, um valor de pH em que exatamente 50% do total inicial do ácido estão associados, os 50% restantes estando na forma de base conjugada. Tal condição será verificada em um valor de pH definido e característico para cada tampão considerado. É nesta situação, ou é neste valor de pH, que o sistema-tampão tem sua eficiência máxima, pois é quando existem, *simultaneamente*, as maiores concentrações possíveis de ácido e base conjugada. Ao redor deste valor de pH, uma unidade acima ou uma unidade abaixo (região assinalada na Fig. 1.1), o tampão ainda é eficaz; além deste intervalo, o sistema deixa de atuar como tampão.

A determinação do pH em que há 50% de dissociação do ácido pode ser obtida experimentalmente por titulação: tomando-se uma solução de um ácido fraco e medindo-se o valor de pH após cada pequena adição de álcali, obtêm-se valores que são representados pelo gráfico da Fig. 1.1 (a). A curva de titulação apresenta uma região achatada, correspondente à região de tamponamento, onde há pequenas variações de pH para adições fixas de ácido ou álcali. No centro desta região, o ponto de inflexão da curva corresponde ao valor de pH onde há 50% de dissociação; neste ponto, [HA] = [A].

Como mencionado anteriormente, entre os ácidos fracos existe uma gradação de força ácida, revelada pelo valor de seus K_a (Tabela 1.1). Soluções de ácidos fracos diferentes, de mesma concentração, apresentam valores diferentes de pH, dependendo da afinidade de cada base conjugada pelo próton: quanto maior o valor de K_a, menor esta afinidade e, portanto, menor o pH da solução.

Suponham-se dois ácidos fracos diferentes, HA e HB, sendo a constante de dissociação (K_a) de HA maior do que a de HB. A base conjugada A tem, portanto, afinidade pelo próton menor do que a base conjugada B. Se estes ácidos forem dissolvidos em água, o ácido HA, cuja base conjugada A retém o próton mais "fracamente", irá dissociar-se mais do que o ácido HB, cuja base conjugada B retém o próton mais "fortemente". Portanto, o ácido HA será um ácido fraco mais forte do que HB. Admita-se agora que ambas as soluções estejam em pH igual a 2 (isto pode ser conseguido adicionando-se um ácido forte a ambas as soluções dos ácidos fracos HA e HB). Para proceder à titulação dos dois ácidos, a partir de pH 2, adiciona-se álcali, gradativamente, a estas soluções. Como já foi analisado, a adição provocará a dissociação dos ácidos; após a adição de uma quantidade conveniente de álcali, haverá uma situação em que 50% do ácido HA estará dissociado, mas menos do que 50% do ácido HB encontrar-se-á dissociado. O valor do pH nesta situação poderia ser 5, por exemplo. Em outras palavras, em pH igual a 5 o ácido HA encontra-se 50% dissociado. Para obter situação análoga para o ácido HB há necessidade de adicionar mais álcali, ou seja, o ácido HB vai apresentar-se 50% dissociado em um valor de pH mais alto. Graficamente, as duas curvas de titulação terão a mesma forma, mas localizadas em regiões diferentes em relação à escala de pH (eixo das ordenadas, como na Fig. 1.1 a). O valor de pH em que um ácido apresenta-se 50% dissociado equivale ao seu pK_a e constitui uma medida da sua força ácida: quanto maior for o valor do pKa, mais fraco será o ácido (Tabela 1.1). Ao mesmo tempo, este valor de pH revela a região em que cada ácido fraco apresenta seu maior poder tamponante. Como será visto a seguir, o pKa corresponde ao co-logaritmo da constante de dissociação do ácido ($-\log K_a$) e é característico para cada ácido.

A equação de Henderson-Hasselbalch relaciona pH, constante de dissociação do ácido e as concentrações de ácido e base conjugada

Tomando em logaritmo a equação que apresenta o valor da constante de equilíbrio em função da concentração das espécies, tem-se

$$K_{eq}\ (\text{ou } K_a) = \frac{[A][H^+]}{[HA]}$$

$$[H^+] = \frac{K_a[HA]}{[A]}$$

$$\log [H^+] = \log K_a + \log \frac{[HA]}{[A]}$$

$$\log [H^+] = \log K_a - \log \frac{[A]}{[HA]}$$

$$-\log [H^+] = -\log K_a + \log \frac{[A]}{[HA]}$$

A expressão $-\log [H^+]$ é definida como pH. Analogamente, $-\log K_a$ é definido como pK_a. Portanto,

$$pH = pK_a + \log \frac{[A]}{[HA]}$$

Esta é a *equação de Henderson-Hasselbalch*, que nada mais é do que a equação de dissociação de um ácido fraco tomada sob a forma logarítmica. De maneira genérica, esta equação pode ser escrita

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]}$$

Verifica-se, por esta equação, que *pKa é o valor de pH que provoca 50% de dissociação do ácido*. De fato, nestas condições, [HA] = [A] e a relação [A]/[HA] vale 1. Portanto,

$$pH = pK_a$$

A equação de Henderson-Hasselbalch define o pK_a em bases operacionais, à semelhança do pH, em relação à concentração de H^+ da solução. Em resumo, a região de eficiência máxima de um tampão (50% de ácido conjugado e 50% de base conjugada) é determinada pelo pK_a de seu ácido fraco e *o pK_a pode ser medido por titulação*.

A equação de Henderson-Hasselbalch permite calcular prontamente a relação entre as concentrações das espécies doadoras e aceptoras de prótons em qualquer pH, para um ácido de pK_a conhecido. Por exemplo, pode-se calcular a razão das concentrações de ácido acético ($pK_a = 4{,}7$) e acetato em pH = 5,7:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$5{,}7 = 4{,}7 + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$1 = \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

ou

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]} = 10$$

No pH 5,7, portanto, haverá 10 vezes mais acetato do que ácido acético. No pH 3,7 ocorrerá o inverso. Generalizando, em valores de pH inferiores ao pK_a de um ácido fraco predomina a sua forma protonada (ácido conjugado), e em valores de pH maiores do que o pK_a predomina a forma desprotonada (base conjugada).

Para o ácido acético, ou melhor, para o tampão acetato, a faixa compreendida entre 3,7 e 5,7 (entre $pH = pK_a - 1$ e $pH = pK_a + 1$) corresponde à região achatada da curva de titulação, isto é, à região de tamponamento (assinalada na Fig. 1.2). Fora destes limites, a concentração de ácido conjugado fica desprezível em relação à de base conjugada, ou vice-versa, e o sistema não se comporta mais como tampão. Assim, em pH 6,7 tem-se

$$6{,}7 = 4{,}7 + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

e

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]} = 100$$

Ou seja, uma solução que contivesse inicialmente 101 moléculas de ácido acético apresentaria no pH = 6,7 uma única molécula do ácido e 100 íons acetato. Neste pH a solução não se comportaria mais como tampão, pois, com tão pequena concentração de ácido, seria incapaz de resistir a adições de álcali.

As afirmativas sobre este exemplo são válidas para a imensa maioria dos sistemas-tampão: a melhor atuação do tampão se dá em valores de pH próximos ao seu pK_a (um caso excepcional encontra-se na Seção 1.4) e com eficiência que depende de sua concentração.

O ácido acético ilustra a regra geral para a escolha do ácido fraco com o qual se pretende fazer uma solução tampão: o ácido fraco constituirá um tampão apropriado se o valor de seu pK_a estiver dentro do intervalo compreendido por uma unidade abaixo e uma unidade acima do valor de pH que se quer manter constante.

A eficiência de um tampão depende de sua concentração

Além da proximidade do pH em que há 50% de dissociação (pK_a), um outro fator determinante da eficiência do tampão é a sua concentração, que é a soma das concentrações do ácido e da base conjugada. Ou seja, um tampão 0,1 M mantém esta concentração em qualquer valor de pH, pois à medida que a concentração do ácido aumenta, a da base

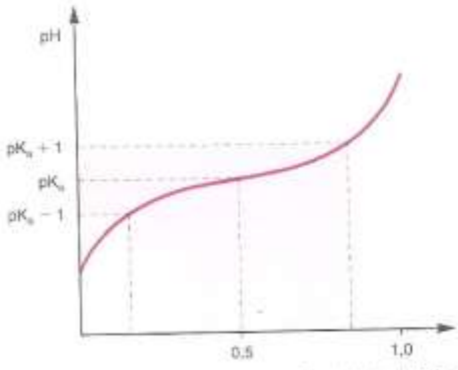


Fig. 1.2 Titulação de um ácido fraco — a região de tamponamento estende-se uma unidade abaixo e acima do pKa.

conjugada diminui, ou vice-versa. Quanto maior a concentração de um tampão, maior a disponibilidade das espécies capazes de doar ou receber prótons; assim, uma solução 0,1 M de um ácido que esteja 50% dissociado será um tampão 10 vezes mais eficiente do que uma solução 0,01 M do mesmo ácido na mesma condição.

Em resumo, *a eficiência de um tampão é proporcional à sua concentração e é máxima no pH igual ao pK_a*. Na prática, o ácido fraco escolhido e um dos seus sais solúveis são dissolvidos em concentrações molares iguais. Assim, para preparar um tampão acetato 0,1 M a pH 4,7, dissolve-se em um litro de água 0,05 mols de ácido acético e 0,05 mols de acetato de sódio. O mesmo resultado seria conseguido pela dissolução de 0,1 mol de ácido acético e adição de álcali suficiente para elevar o pH até 4,7; quando o pH atingir este valor, e o volume for acertado para um litro, a composição da solução será idêntica ao caso anterior (50% do ácido e 50% da base conjugada).

1.4 TAMPÕES BIOLÓGICOS

Os seres vivos mantêm constante o seu pH interno

Os tampões biológicos são aqueles encontrados nos seres vivos; na espécie humana, por exemplo, há tampões capazes de manter o pH do sangue muito próximo de 7,4. Não são muitos os ácidos fracos que apresentam valores de pK_a em torno de 7,4. Os principais tampões são o fosfato, as proteínas e o bicarbonato.

O sistema $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ tem pK_a igual a 6,8, constituindo um tampão apropriado para valores de pH entre 5,8 e 7,8. No plasma, entretanto, a concentração deste tampão é muito baixa, tornando sua eficiência muito reduzida. Intracelularmente (pH do citossol ≅ 7), sua concentração é maior e sua eficácia é considerável.

O efeito tamponante das proteínas é devido a grupos ionizáveis dos aminoácidos ($-COO^-$, $-NH_3^+$ etc.), que são ácidos fracos. Entretanto, os valores de pK_a da maioria desses grupos estão muito distantes de 7,4 (ver Tabela 2.1, Seção 2.1), tornando-os ineficazes como tampões neste pH. Os únicos aminoácidos que apresentam um grupo com pK_a compatível com o tamponamento a pH fisiológico são a histidina e a cisteína. Adicionalmente, as proteínas exercem efeito tamponante muito discreto no plasma, por estarem presentes em baixas concentrações — vale lembrar que a eficiência do tampão depende de sua concentração. Sua importância no tamponamento celular é maior do que no plasmático, porque atingem níveis mais elevados nas células. A exceção é a *hemoglobina*, que, juntamente com o *tampão bicarbonato* (ver a seguir), é a responsável principal pela manutenção do pH plasmático (Capítulo 3).

O ácido carbônico dissocia-se em bicarbonato e H^+:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

O valor do pK_a deste ácido é 3,8, incompatível, portanto, com o tamponamento fisiológico. O ácido carbônico apresenta, entretanto, a característica peculiar de estar em equilíbrio com o CO_2 dissolvido em água segundo a equação:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Esta reação processa-se rapidamente na ausência de catalisadores; ainda assim, a sua velocidade é incompatível com as necessidades fisiológicas. As hemácias contêm uma enzima, a *anidrase carbônica*, uma das enzimas mais eficientes que se conhece, capaz de acelerar a reação por cerca de 10^7 vezes. Assim, o CO_2 produzido nos tecidos difunde-se para o plasma e para o interior das hemácias, onde é transformado imediatamente em H_2CO_3, que se dissocia em HCO_3^- e H^+:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

A quantidade de CO_2 dissolvido depende da pressão parcial de CO_2 na atmosfera e, nas condições atmosféricas comuns, o pK_a do ácido carbônico eleva-se para 6,1. A constante de equilíbrio do tampão bicarbonato, incorporando-se a concentração de H_2O, por ser praticamente constante, é:

$$K_{eq} = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]}$$

O CO_2 (o anidrido do ácido carbônico) equivale ao "ácido" conjugado do tampão bicarbonato. A concentração de CO_2 dissolvido é função da pressão parcial desse gás (pCO_2) multiplicada por um fator de conversão igual a 0,03 $mEq \cdot L^{-1} \cdot mmHg^{-1}$, a 37°C. Portanto,

$$K_{eq} = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{0,03 \cdot pCO_2}$$

Nas condições fisiológicas habituais, $K_{eq} = 7{,}95 \times 10^{-7}$ e pK_a (ou $-\log K_{eq}$) = 6,1 e a equação de Henderson-Hasselbalch para este sistema-tampão torna-se:

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{0{,}03 \cdot pCO_2}$$

Neste sistema, o CO_2 dissolvido no plasma está em contato com o CO_2 atmosférico através do espaço alveolar, permitindo um rápido ajuste da concentração de H^+ quando esta tende a variar. O tampão bicarbonato constitui, por isto, um *sistema aberto*, muito mais eficiente no controle do pH do que um sistema fechado. De fato, supondo o sistema fechado, uma adição de ácido forte (H^+) faria com que a maior parte dos prótons combinasse com a base conjugada (HCO_3^-), diminuindo sua concentração e aumentando a concentração do ácido (CO_2). A razão

$$\frac{[HCO_3^-]}{0{,}03 \cdot pCO_2}$$

ficaria, portanto, muito diminuída, e o pH assumiria um valor muito baixo. Como o sistema é aberto, a mesma adição de prótons faz diminuir a concentração de base conjugada, mas *não* aumenta a concentração de ácido conjugado, já que a concentração de CO_2 ajusta-se rapidamente à pressão parcial deste gás na atmosfera. A relação entre as concentrações de HCO_3^- e CO_2, neste caso, diminui, mas muito menos do que no caso do sistema fechado. Em outras palavras, no sistema fechado a adição de ácido provoca uma queda de pH muito maior do que no sistema aberto. O fato de o sistema bicarbonato ser um sistema aberto é que permite sua eficácia na manutenção do pH plasmático.

No pH fisiológico, a proporção entre as concentrações de HCO_3^- e CO_2 é de 20:1, mostrando que o sistema é mais efetivo para resistir à acidificação do que à alcalinização. Para o estudo do funcionamento associado deste sistema-tampão com a hemoglobina, consultar o Capítulo 3.

BIBLIOGRAFIA

Atkins PW, Palma J: *Physical Chemistry*, 7th ed. W.H. Freeman, 2001.
Segel IH: *Biochemical Calculations: How to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry*, 2nd ed. Wiley, 1976.
Solomons TWG, Fryle CB: *Organic Chemistry*, 8th ed. Wiley, 2003.
Zumdahl SS: *Chemical Principles*, 4th ed. Houghton Mifflin, 2002.

2

Aminoácidos e Proteínas

As proteínas, além de constituírem o componente celular mais abundante, são as moléculas mais diversificadas quanto à forma e à função. As funções que desempenham são estruturais e dinâmicas — são componentes do citoesqueleto e de estruturas de sustentação, como, por exemplo, o colágeno, e participam de quase todos os processos biológicos, já que incluem as enzimas, que catalisam as milhares de reações químicas que ocorrem nos organismos. Outra função dinâmica das proteínas é o transporte de moléculas (o transporte de oxigênio por hemoglobina será discutido no Capítulo 3). Os mecanismos de defesa do organismo incluem proteínas, como as imunoglobulinas e o interferon, que atuam no combate a infecções bacterianas e virais. Muitas proteínas participam do controle global do metabolismo, devido à sua ação hormonal, como é o caso da insulina. São também responsáveis por mecanismos contráteis, sendo de particular importância as proteínas actina e miosina, que atuam na contração muscular (Capítulo 22). Até mesmo a atividade dos genes é controlada por proteínas: proteínas reguladoras ligam-se ao DNA em sítios específicos, localizados próximo aos genes, alterando sua expressão. Estas proteínas, no genoma de mamíferos, são capazes de reconhecer o sítio regulador de um determinado gene, dentre dezenas de milhares de genes diferentes.

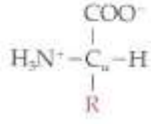
2.1 AMINOÁCIDOS COMPONENTES DE PROTEÍNAS

As proteínas são polímeros de aminoácidos

As proteínas, apesar de apresentarem estruturas e funções tão variadas, são sintetizadas a partir de apenas 20 aminoácidos diferentes. Ainda que o número de monômeros diversos pareça pequeno, as possibilidades de existirem proteínas distintas são espantosamente grandes. Considerando-se a formação de proteínas hipotéticas contendo somente 20 aminoácidos, um de cada tipo, poderiam ser obtidas $2{,}4 \times 10^{18}$ moléculas diferentes! Como as proteínas são compostas por centenas de aminoácidos, cada um deles podendo estar presente mais de uma vez, a probabilidade de construção de moléculas diferentes é praticamente infinita.

Os aminoácidos diferem entre si pela estrutura da cadeia lateral

Os aminoácidos são compostos que apresentam, na sua molécula, um *grupo amino* ($-NH_2$) e um *grupo carboxila* ($-COOH$); a única exceção é a prolina, que contém um grupo imino ($-NH-$) no lugar do grupo amino. Em pH fisiológico, esses grupos estão na forma ionizada: $-NH_3^+$, $-COO^-$ e $-NH_2^+-$. Os aminoácidos têm uma fórmula básica comum, na qual os grupos amino e carboxila estão ligados ao carbono α, ao qual também se liga um átomo de hidrogênio e um grupo variável chamado *cadeia lateral* ou *grupo R*:



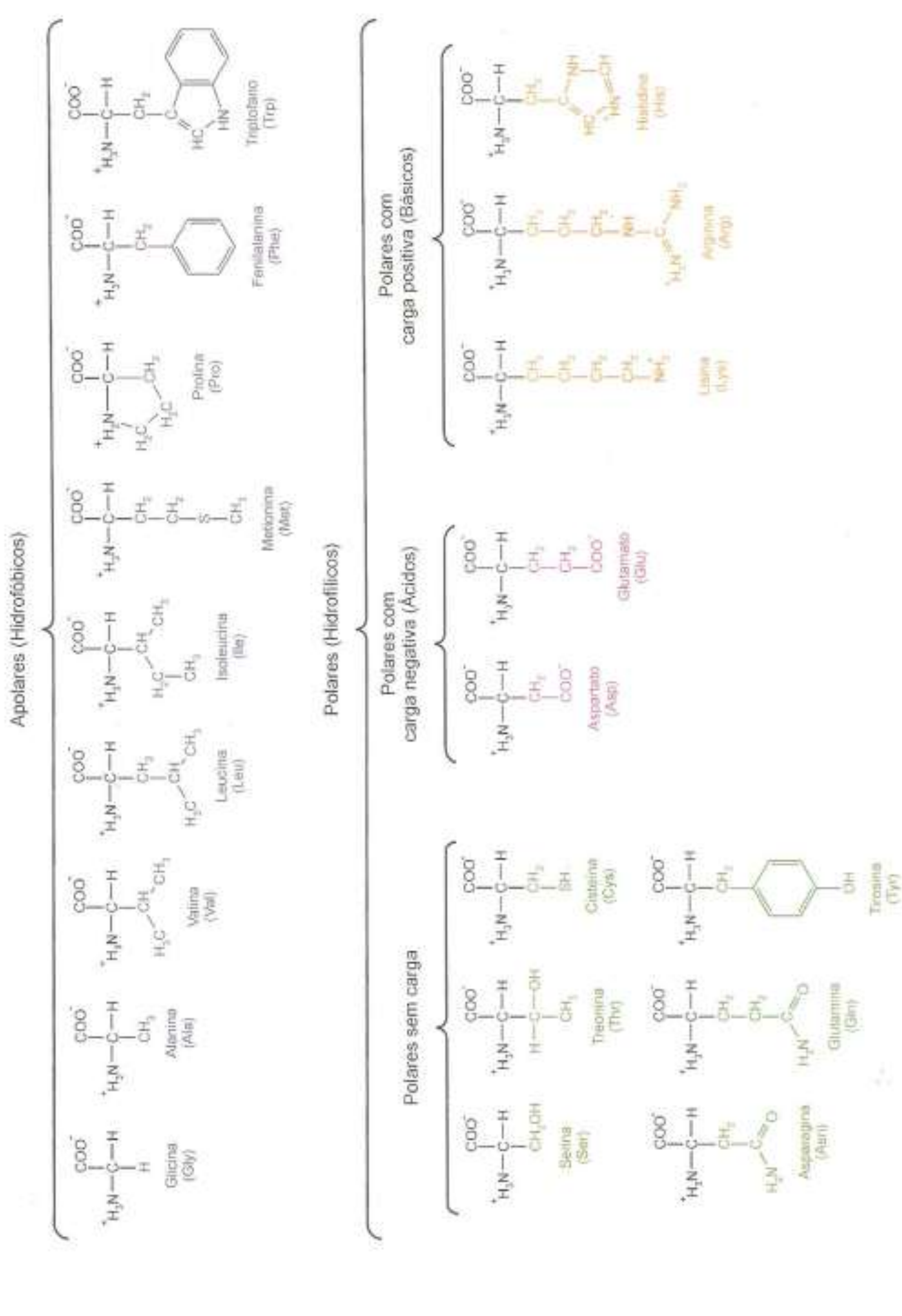


Fig. 2.1 Estrutura e classificação dos aminoácidos.

Tabela 2.1 Valores de pK_a dos aminoácidos, na forma livre, ou incorporados em proteínas (grupos R, carboxila e amino terminais)[1]

Aminoácidos	pK_1 ($\alpha-COO^-$)	pK_2 ($\alpha-NH_3^+$)	pK_R (grupo R)	pK_a de aminoácidos em proteínas		
				Grupos R	COO^- terminal	NH_3^+ terminal
Glicina	2,35	9,78				
Alanina	2,35	9,87				
Valina	2,29	9,74				
Leucina	2,33	9,74				
Isoleucina	2,32	9,76				
Metionina	2,13	9,28				
Prolina	1,95	10,64				
Fenilalanina	2,20	9,31				
Triptofano	2,46	9,41				
Serina	2,19	9,21				
Treonina	2,09	9,10				
Asparagina	2,14	8,72				
Glutamina	2,17	9,13			3,5-4,0	7,6-9,0
Cisteína	1,92	10,70	8,37	8,0-9,0		
Tirosina	2,20	9,21	10,46	9,5-10,5		
Lisina	2,16	9,06	10,54	9,5-10,5		
Arginina	1,82	8,99	12,48	11,5-12,5		
Histidina	1,80	9,33	6,04	6,0-7,4		
Aspartato	1,99	9,90	3,90	4,0-5,5		
Glutamato	2,10	9,47	4,07	4,0-5,5		

[1]As proteínas são polímeros de aminoácidos, formados pela ligação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino de outro (Seção 2.3). Sendo assim, restam na estrutura da proteína os grupos R (cadeias laterais) dos aminoácidos e os grupos carboxila e amino dos aminoácidos presentes nas duas extremidades da cadeia polipeptídica (grupo carboxila terminal e grupo amino terminal). O valor de pK_a de todos estes grupos varia de uma proteína para outra ou em regiões diferentes de uma mesma proteína; estão indicados os valores mais comumente encontrados.

As propriedades das cadeias laterais dos aminoácidos — principalmente o fato de algumas delas terem afinidade pela água e outras não — são importantes para a conformação das proteínas e, portanto, para sua função. Sendo assim, os aminoácidos são classificados, de acordo com a polaridade do grupo R, em duas grandes categorias: aminoácidos apolares (grupo R hidrofóbico) e aminoácidos polares (grupo R hidrofílico) (Fig. 2.1).

Os aminoácidos *apolares* têm grupos R constituídos por cadeias com caráter de hidrocarboneto, que não interagem com a água. Têm geralmente uma localização interna na molécula de proteína. Pertencem a este grupo: *glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina* e *triptofano*.

Os aminoácidos classificados como *polares* são os que têm, nas cadeias laterais, grupos com carga elétrica líquida ou grupos com cargas residuais, que os capacitam a interagir com a água. São geralmente encontrados na superfície da molécula proteica. Estes aminoácidos são subdivididos em três categorias, segundo a carga apresentada pelo grupo R em pH 7: *aminoácidos básicos*, se a carga for positiva; *aminoácidos ácidos*, se a carga for negativa; e *aminoácidos polares sem carga*, se a cadeia lateral não apresentar carga líquida. Os aminoácidos básicos são *lisina, arginina* e *histidina*. O valor de pK_a do grupo ionizável presente na cadeia lateral de lisina e de arginina (amino e guanidino, com pK_a = 10,54 e pK_a = 12,48, respectivamente) mostra que, em pH neutro, esses grupos estão protonados (Tabela 2.1). A cadeia lateral da histidina (grupo imidazólico, com pK_a = 6,04) está muito menos ionizada em pH 7; como o valor de seu pK_a está uma unidade abaixo deste pH, apenas 10% das moléculas de histidina estarão com o grupo R protonado (ver a equação de Henderson-Hasselbalch, Seção 1.3). Os aminoácidos ácidos são os dicarboxílicos: *aspartato* e *glutamato*; o pK_a de suas

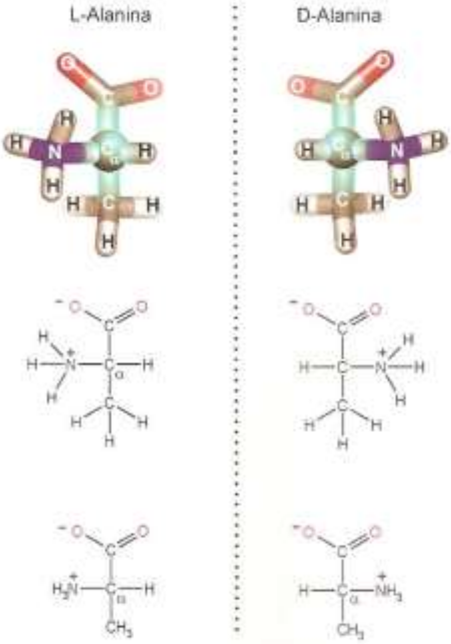


Fig. 2.2 Isômeros L e D da alanina, em três representações moleculares diferentes. A linha pontilhada indica o plano de um espelho.

cadeias laterais é 3,90 e 4,07, respectivamente, e, portanto, em pH neutro, estão desprotonadas. Os aminoácidos polares sem carga são *serina*, *treonina* e *tirosina*, com um grupo hidroxila na cadeia lateral; *asparagina* e *glutamina*, com um grupo amida; e *cisteína*, com um grupo sulfidrila. A Tabela 2.1 apresenta os valores de pK_a que os aminoácidos podem apresentar quando estão incorporados em proteínas.

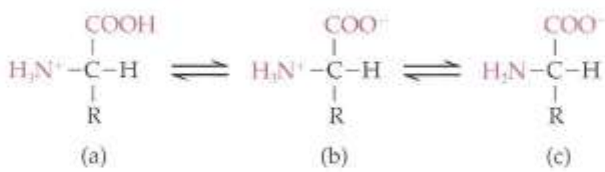
As proteínas são formadas por L-aminoácidos

O carbono α de todos os aminoácidos, com exceção da glicina, é assimétrico, já que está ligado a quatro grupos diferentes: $-NH_3^+$, $-COO^-$, $-H$ e $-R$. Na glicina, este carbono não é assimétrico porque o grupo R é constituído por $-H$. Os aminoácidos com carbono α assimétrico apresentam dois isômeros opticamente ativos, os isômeros D e L, que são imagens especulares um do outro (Fig. 2.2). Todas as proteínas encontradas nos seres vivos são formadas por L-aminoácidos. Os D-aminoácidos aparecem somente em certos antibióticos e em peptídios componentes da parede de algumas bactérias. Os aminoácidos com configuração D, assim como outros aminoácidos exóticos encontrados nas células, são formados por modificações dos 20 aminoácidos proteicos ou são produtos intermediários das vias de síntese destes compostos.

2.2 IONIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

A carga elétrica dos aminoácidos varia com o pH

Os aminoácidos têm pelo menos dois grupos ionizáveis, que podem existir na forma protonada ($-COOH$, $-NH_3^+$) ou desprotonada ($-COO^-$, $-NH_2$), dependendo do pH do meio em que se encontram.



Como se deduz pelos valores de seus pK_a (Tabela 2.1), em soluções muito ácidas, os dois grupos apresentam-se protonados (a); em pH muito alcalino, ambos apresentam-se desprotonados (c); e, em soluções próximas da neutralidade ou na forma cristalina, o aminoácido apresenta-se como um íon dipolar (b).

A conversão entre as formas *a*, *b* e *c* em função do pH do meio é refletida na curva de titulação do aminoácido. Quando o aminoácido tem apenas dois grupos ionizáveis, como a alanina, a sua curva de titulação (Fig. 2.3) assemelha-se à composição das curvas de titulação de dois ácidos fracos com valores de pK_a muito diferentes, como, por exemplo, um ácido carboxílico e uma amina primária (Capítulo 1). Esta semelhança é resultado da presença do grupo carboxila e do grupo amino na mesma molécula: o aminoácido. As duas regiões de tamponamento observadas na curva correspondem à ionização do grupo carboxila (conversão da forma *a* em *b*) e do grupo amino (conversão de *b* em *c*), com valores de pK_a de 2,35 e 9,87, respectivamente.

Outros aminoácidos monoamínicos e monocarboxílicos apresentarão curvas de titulação similares, apenas variando a região de pH em que se dá o tamponamento. A curva de titulação de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis apresenta uma terceira região de tamponamento, correspondente ao seu terceiro pK_a. Isto ocorre com os aminoácidos ácidos, básicos, cisteína e tirosina.

Cada aminoácido apresenta-se neutro em um valor de pH

A carga elétrica total da molécula de um aminoácido resulta da soma algébrica das cargas apresentadas pelos seus grupos ionizáveis, as quais, por sua vez, dependem dos valores de seus pK_a e do pH do meio. Assim, o grupo carboxila pode apresentar-se sem carga ou com carga negativa; o grupo amino é neutro ou tem carga positiva.

A curva de titulação de um aminoácido monoamínico e monocarboxílico, representada na Fig. 2.3, inicia-se em pH muito ácido, abaixo do pK_a do grupo carboxila. Nesta situação, com grande excesso de prótons, tanto a carboxila quanto o grupo amino estarão protonados, o que confere à maioria das moléculas do aminoácido uma carga líquida positiva (forma *a*). À medida que se adiciona álcali, o valor do pH sobe gradativamente, aumentando a dissociação do grupo carboxila e, conseqüentemente, a concentração da forma com uma carga negativa e uma positiva, ou seja, a forma eletricamente neutra (forma *b*). Prosseguindo a adição de álcali, o valor do pH continua aumentando, até que se inicia a dissociação do grupo amino e aumenta a concentração da forma com carga negativa (forma *c*). A forma eletricamente neutra (forma *b*) só poderá, portanto, existir acima do pK_a do grupo carboxila e abaixo do pK_a do grupo amino e será mais abundante no pH eqüidistante dos dois valores de pK_a.

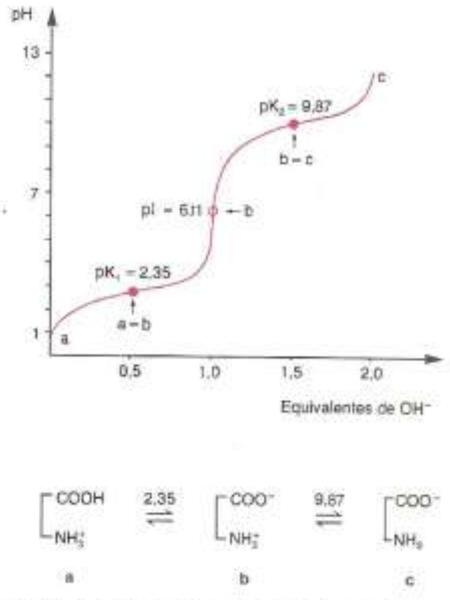


Fig. 2.3 Curva de titulação da alanina e esquema de suas formas iônicas *a*, *b*, *c*.

Os aminoácidos monoamínicos e dicarboxílicos (aspartato e glutamato) possuem um grupamento que pode apresentar carga positiva e dois grupamentos que podem apresentar carga negativa. Neste caso, a forma com carga líquida igual a zero será obtida quando um dos grupos carboxila estiver protonado (sem carga) e o outro desprotonado (com carga negativa): a carga negativa do grupo carboxila desprotonado será compensada pela carga positiva do grupamento amino protonado. O pH em que esta forma será a predominante eqüidista dos valores de pK_a das duas carboxilas. Esta é a situação da enorme maioria das moléculas — a pequena fração de moléculas com um grupo carboxila protonado (e, portanto, com carga positiva) é compensada por igual fração de moléculas que apresentam o outro grupo carboxila desprotonado (e, portanto, com carga negativa).

Por um raciocínio análogo, para os aminoácidos com um grupo carboxila e dois grupos que podem apresentar carga positiva (lisina, histidina e arginina), a forma eletricamente neutra será mais abundante em um valor de pH eqüidistante dos valores de pK_a dos dois grupamentos básicos do aminoácido. A equação de Henderson-Hasselbalch (Seção 1.3) permite verificar qual é a forma predominante do aminoácido em qualquer valor de pH.

Generalizando, o pH onde predomina a forma eletricamente neutra é a média aritmética de dois valores de pK_a. Este valor de pH é chamado *ponto isoelétrico (pI)* do aminoácido:

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

No pH equivalente ao pI, os aminoácidos comportam-se como moléculas neutras: não migram quando submetidos a um campo elétrico (eletroforese, Seção 2.10.2).

Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} a serem considerados no cálculo do pI dependem do aminoácido considerado. Para os que não contêm grupamentos ionizáveis na cadeia lateral, utilizam-se os valores de pK_a dos grupos amino e carboxila; para aminoácidos com três grupamentos ionizáveis, usam-se os valores de pK_a dos grupos com mesmo sinal de carga. A única exceção a esta regra é a *tirosina*, que apresenta valores de pK_a iguais a 2,20 (carboxila), 9,21 (amino) e 10,46 (fenólico). O grupo fenólico apresentará carga negativa em valores de pH maiores do que o pK_a do grupo amino, e o ponto isoelétrico é a média entre o pK_a do grupo carboxila e o do grupo amino.

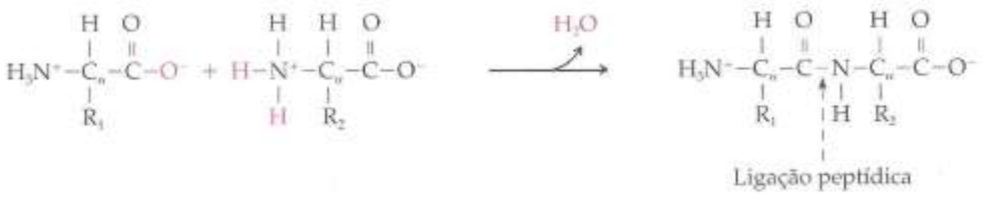
Os aminoácidos não constituem tampões fisiológicos importantes

Uma análise dos valores de pK_a dos aminoácidos (Tabela 2.1) revela que eles não apresentam poder tamponante significativo em pH fisiológico. Todavia, quando os aminoácidos fazem parte de uma proteína, o valor de pK_a de suas cadeias laterais e dos grupos carboxila e amino terminais da proteína (Tabela 2.1) pode sofrer variações consideráveis, em relação ao seu valor no aminoácido livre. Essas alterações resultam de características da região da proteína onde essas cadeias estão inseridas, tais como: polaridade, determinada pela proximidade de grupamentos com carga; exclusão de moléculas de água, como ocorre no interior da molécula proteica, e possibilidade de formação de pontes de hidrogênio (Seção 2.4). Assim sendo, aminoácidos componentes de certas proteínas participam de maneira decisiva dos sistemas-tampão dos organismos. Um caso importante de alteração de pK_a de aminoácidos, que tem implicações decisivas para o tamponamento do sangue, é o da *hemoglobina*, analisado no Capítulo 3.

2.3 POLÍMEROS DE AMINOÁCIDOS: PEPTÍDIOS E PROTEÍNAS

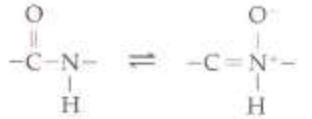
Os aminoácidos ligam-se formando cadeias polipeptídicas

Os aminoácidos podem formar polímeros pela ligação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino de outro. Esta ligação carbono-nitrogênio, chamada *ligação peptídica*, é obtida, teoricamente, por exclusão de uma molécula de água. Quimicamente, a formação da ligação peptídica pode ser representada pela seguinte equação:



Esta reação, como está escrita, ***jamais*** ocorre. Nos seres vivos, a união dos aminoácidos por ligação peptídica não é feita por reação direta entre eles, mas através de um complexo aparato de síntese proteica, que inclui ribossomos, ácidos ribonucleicos, várias proteínas e enzimas. A equação é apenas um esquema didático para descrever a formação da ligação peptídica.

As propriedades da ligação peptídica impõem restrições ao dobramento do polímero formado. A ligação peptídica, apesar de ser representada por um único traço de ligação, tem características intermediárias entre uma ligação simples e uma dupla ligação, devido às interações entre duas formas de ressonância:



A conseqüência desse caráter parcial de dupla ligação é que não há possibilidade de rotação em torno da ligação peptídica. Assim sendo, os quatro átomos dos grupamentos que participam da ligação peptídica — C, O, N, H — ficam dispostos em um plano rígido, constituindo o que se costuma chamar de *grupo peptídico* ou *unidade peptídica* (cada retângulo na Fig. 2.4 a).

Todavia, existem pontos de dobramento entre as unidades peptídicas rígidas, graças à possibilidade de rotação (indicada por setas na Fig. 2.4 b) em torno das ligações com o carbono α ($C_\alpha - C$ e $N - C_\alpha$), que são ligações efetivamente simples.

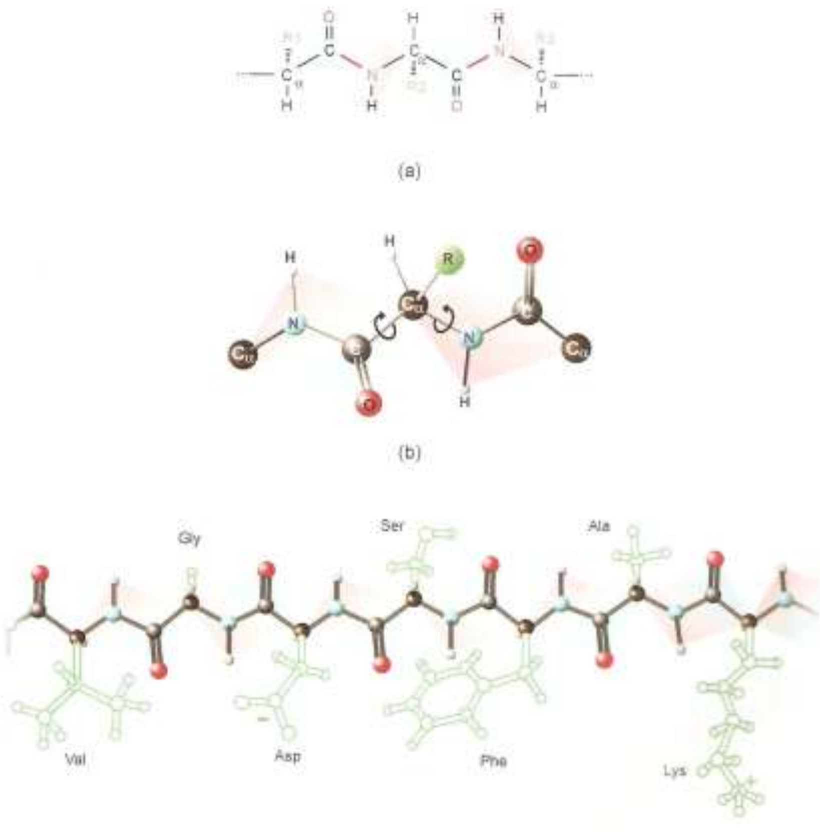


Fig. 2.4 a) Os quatro átomos dos grupamentos envolvidos na ligação peptídica (em vermelho) dispõem-se em um plano, a unidade peptídica, representada por um retângulo. b) As unidades peptídicas podem movimentar-se umas em relação às outras, por ser possível a rotação (indicada pelas setas) em torno das ligações com o carbono α. c) A cadeia polipeptídica consiste em um arranjo flexível de unidades planas, as unidades peptídicas, conectadas por uma articulação, o carbono α. As cadeias laterais dos aminoácidos estão assinaladas em verde.

O polímero formado pode, portanto, ser visualizado como uma cadeia constituída por unidades planares (unidades peptídicas), unidas entre si por uma articulação flexível — o carbono α (Fig. 2.4 c). Esta cadeia chama-se *cadeia polipeptídica*.

A cadeia polipeptídica pode conter de dois a milhares de aminoácidos (ou, mais rigorosamente, *resíduos de aminoácidos*, já que, em cada ligação peptídica, foi eliminada uma molécula de água). Quando o número de aminoácidos é igual a 2, o polímero é chamado de *dipeptídio*; com 3 é um *tripeptídio*, e assim por diante. Polímeros contendo até 30 aminoácidos são conjuntamente chamados de *oligopeptídios* ou simplesmente *peptídios*; quando o número é maior, são chamados de *polipeptídios*. Qualquer que seja o número de aminoácidos, os peptídios apresentam um grupamento amino livre em uma das extremidades — amino terminal — e um grupo carboxila livre na outra — carboxila terminal.

Muitos peptídios encontrados na natureza desempenham funções importantes, atuando como hormônios (encefalinas, oxitocina, vasopressina, glucagon), antibióticos (gramicidina), agentes redutores (glutationa) etc. (Tabela 2.2). Peptídios com aplicação terapêutica são sintetizados em laboratórios industriais; um exemplo é o aspartame, um adoçante artificial com alto poder edulcorante. O aspartame é um dipeptídio modificado, formado por aspartato e fenilalanina, esterificada a um grupo metila.

As *proteínas* podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas; contêm, geralmente, mais de 50 aminoácidos (Tabela 2.3) e desempenham uma função específica. Todas as proteínas, com poucas exceções (colágeno, Seção 2.5), contêm todos os 20 aminoácidos, em proporções que variam muito de proteína para proteína (Tabela 2.4). Cada proteína apresenta uma estrutura tridimensional definida e característica. Apesar de existirem inúmeras conformações teoricamente possíveis, todas as moléculas de uma dada proteína, ao serem sintetizadas, assumem a mesma conformação espacial. Esta configuração, entretanto, não é permanentemente fixa, e, muitas vezes, alterações estruturais transitórias estão relacionadas com o controle da função desempenhada pela proteína.

Tabela 2.2 Peptídios de importância biológica

Peptídios	Número de aminoácidos	Glândulas/células produtoras	Efeitos principais
Encefalinas	5	Hipófise anterior e medula adrenal	Analgesia
Oxitocina	9	Hipófise posterior	Contração da musculatura uterina no parto e de glândulas mamárias na lactação
Vasopressina	9	Hipófise posterior	Aumento da pressão sangüínea e da reabsorção de água pelo rim
Glucagon	29	Células α do pâncreas	Aumento da produção de glicose pelo fígado no jejum
Gramicidina	10	Cepas de *Bacillus brevis*	Antibiótico
Glutationa	3	Maioria das células	Proteção de grupos SH de proteínas, manutenção do Fe^{2+} da hemoglobina e dissipação de H_2O_2

Tabela 2.3 Características de composição de algumas proteínas

Proteína	Número de aminoácidos	Número de cadeias polipeptídicas
Insulina (bovina)	51	2
Lisozima (clara de ovo)	129	1
Mioglobina (eqüina)	153	1
Hemoglobina (humana)	574	4
Aspartato transcarbamoilase (*E. coli*)	2.700	12
RNA polimerase (*E. coli*)	4.100	5
Apolipoproteína B (humana)	4.536	1

Tabela 2.4 Composição em aminoácidos de três proteínas

Aminoácido	Número de aminoácidos por molécula de proteína		
	Quimotripsinogênio (bovino)	Lisozima (clara de ovo)	Citocromo c (humano)
Glicina	23	12	13
Alanina	22	12	6
Valina	23	6	3
Leucina	19	8	6
Isoleucina	10	6	8
Metionina	2	2	3
Prolina	9	2	4
Fenilalanina	6	3	3
Triptofano	8	6	1
Serina	28	10	2
Treonina	23	7	7
Asparagina	15	13	5
Glutamina	10	3	2
Tirosina	4	3	5
Cisteína	10	8	2
Lisina	14	6	18
Arginina	4	11	2
Histidina	2	1	3
Aspartato	8	8	3
Glutamato	5	2	8
Total	245	129	104

2.4 ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS

A seqüência de aminoácidos determina a estrutura espacial da proteína

A organização espacial da proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. A seqüência dos aminoácidos irá determinar o tipo de interação possível entre as cadeias laterais, que, como já exposto, apresentam características de carga, volume e reatividade com a água muito variáveis. A organização tridimensional de uma proteína, desde a seqüência de aminoácidos, passando pelo enrolamento da cadeia polipeptídica até a associação de várias cadeias, pode ser descrita em níveis estruturais de complexidade crescente.

A estrutura das proteínas pode ser descrita em quatro níveis

A *estrutura primária* é a seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, que é determinada geneticamente, sendo específica para cada proteína. Por convenção, a estrutura primária é escrita na direção amino terminal → carboxila terminal. Exemplificando, os peptídios hipotéticos Ala−Ser−Lys e Lys−Ser−Ala são diferentes, porque, no primeiro caso, é o grupo amino da alanina que está livre e, no segundo caso, é o da lisina[1].

A *estrutura secundária* descreve as estruturas regulares tridimensionais formadas por segmentos da cadeia polipeptídica. Duas organizações são particularmente estáveis: o enrolamento da cadeia ao redor de um eixo e a interação lateral de segmentos de uma cadeia polipeptídica ou de cadeias diferentes. Estas conformações são denominadas, respectivamente, α-hélice e folha β pregueada, porque foram descobertas nesta ordem. A extensão do trecho da cadeia polipeptídica que se organiza nessas duas configurações pode variar de alguns a dezenas de aminoácidos, conforme a proteína. A α-hélice e a folha β pregueada estabilizam-se por *pontes de hidrogênio*[2] entre o nitrogênio e o oxigênio dos

[1] Os resíduos de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica são numerados de 1 a *n* a partir do amino terminal. Nos exemplos citados, a numeração seria: Ala1–Ser2–Lys3 e Lys1–Ser2–Ala3.

[2] Um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a um átomo eletronegativo apresenta carga parcial positiva e pode associar-se a um outro átomo eletronegativo, formando uma ligação mais fraca, não-covalente, chamada *ponte de hidrogênio (ponte de H)*. Nos sistemas biológicos, os átomos eletronegativos são, geralmente, oxigênio e nitrogênio e, menos freqüentemente, enxofre. A energia de formação de uma ponte de hidrogênio (4 a 30 $kJ \cdot mol^{-1}$) é cerca de vinte vezes menor que a energia de formação de ligações covalentes.

grupos – NH e – C = O, constituintes das unidades peptídicas. Embora a ponte de hidrogênio seja uma ligação fraca, o elevado número destas ligações confere grande estabilidade a essas estruturas.

A *α-hélice* é mantida por pontes de hidrogênio entre uma unidade peptídica e a quarta unidade peptídica subseqüente; estas pontes de hidrogênio dispõem-se paralelamente ao eixo da hélice. A α-hélice tem um passo de 0,54 nm e apresenta 3,6 resíduos de aminoácidos por volta (Fig. 2.5). As cadeias laterais dos aminoácidos estão projetadas para fora da hélice e, evidentemente, não participam das pontes de hidrogênio, estabelecidas unicamente entre os grupamentos das unidades peptídicas. Por esta razão, a estabilidade da α-hélice independe, até certo ponto, do tipo de cadeia lateral, e muitas seqüências diferentes de aminoácidos podem adotar esta configuração. Todavia, certas seqüências de aminoácidos não podem organizar-se em α-hélice. Isto ocorre, por exemplo, quando a cadeia polipeptídica contém vários aminoácidos adjacentes de mesma carga, que se repelem fortemente. Assim, polilisina em solução a pH 7 não forma α-hélice, pois apresenta as cadeias laterais carregadas positivamente. Em pH 12, contudo, a maioria das cadeias laterais está desprotonada e a polilisina forma α-hélice espontaneamente. A prolina, quando participa da ligação peptídica, não apresenta o átomo de hidrogênio no grupo imino e, portanto, não pode formar ponte de hidrogênio — este aminoácido é geralmente encontrado entre segmentos em α-hélice.

A *folha β pregueada* é uma estrutura também mantida por pontes de hidrogênio entre as unidades peptídicas. Neste caso, entretanto, as ligações são estabelecidas entre cadeias polipeptídicas diferentes ou entre segmentos distantes de uma mesma cadeia. Estas cadeias, ou segmentos de cadeia, exibem uma conformação mais distendida que a α-hélice e dispõem-se lado a lado, o que dá à estrutura formada o aspecto de uma folha de papel pregueada. As pontes de hidrogênio são perpendiculares ao eixo das cadeias, e os grupos R dos aminoácidos projetam-se para cima e para baixo do plano da folha pregueada (Fig. 2.6).

Os dois tipos principais de estruturas secundárias regulares (α-hélice e folha β pregueada) ocorrem nas proteínas em proporções muito diversas. Um exemplo extremo é a *mioglobina* — uma proteína de músculo transportadora de oxigênio — que apresenta cerca de 80% da cadeia polipeptídica organizada em α-hélice. Sua molécula é formada por oito segmentos em α-hélice, separados por trechos sem estrutura regular, que permitem o dobramento da cadeia ("cotovelos"), alguns deles resultantes da presença de prolina (Fig. 2.7). No outro extremo, proteínas como a *concanavalina A* — proteína vegetal do grupo das *lectinas*, que são proteínas com alta afinidade por açúcares específicos e que, por isto, são utilizadas na purificação de carboidratos por cromatografia de afinidade (Seção 2.10.1) — têm alto conteúdo de folha β pregueada e não formam α-hélice (Fig. 2.8). A maioria das proteínas exibem os dois tipos de estrutura se-

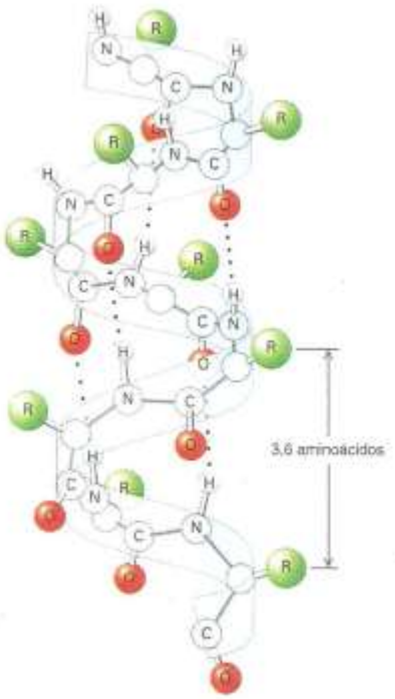


Fig. 2.5 Modelo da α-hélice: a cadeia polipeptídica forma uma espiral, estabilizada por pontes de H entre os grupos –C=O e –NH das ligações peptídicas. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos dispõem-se no exterior da hélice. Reproduzida de Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. & Darnell, J.: Molecular Cell Biology, 4[th] edition. W. H. Freeman and Company, 2000.

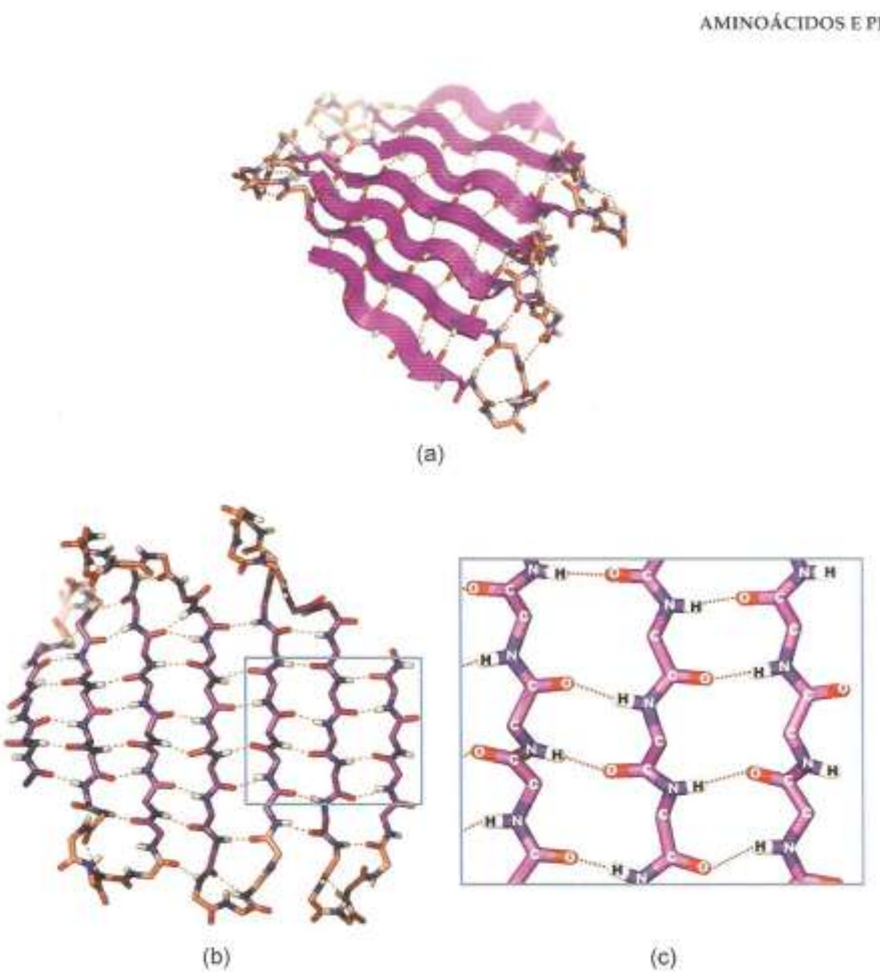


Fig. 2.6 Folha β pregueada. a) Esquema de parte da molécula de uma proteína — os segmentos da cadeia polipeptídica com este tipo de estrutura secundária são simbolizados por setas onduladas que apontam na direção amino terminal → carboxila terminal. b) Representação plana dos dobramentos da cadeia polipeptídica e da disposição paralela dos diversos segmentos que, associados por pontes de H intracadeia, formam a folha β pregueada. c) Detalhamento mostrando os grupos que estabelecem as pontes de H. Não estão representadas as cadeias laterais dos aminoácidos.

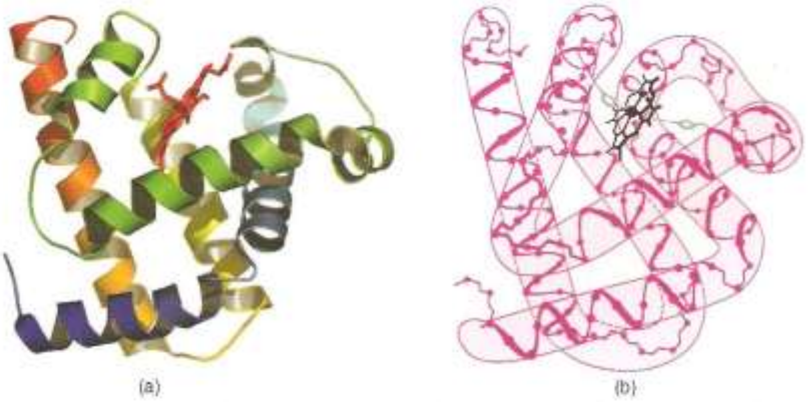


Fig. 2.7 Modelos da mioglobina mostrando: a) os diversos trechos em α-hélice (representados por espirais), alternados por segmentos desenrolados; b) os dobramentos da cadeia da mioglobina, onde as esferas representam o carbono α dos resíduos de aminoácidos. A cadeia polipeptídica liga-se ao grupo heme — vermelho em (a) e preto em (b) —, descrito no Capítulo 3.



Fig. 2.8 Concanavalina A, uma proteína que se organiza, predominantemente, em folha β pregueada.

cundária, como acontece com a *toxina diftérica* (Fig. 2.9), produzida por uma bactéria que infecta o trato respiratório superior de seres humanos.

Cada proteína tem um conteúdo próprio de α-hélice e de folha β pregueada, determinado pela sua estrutura primária, como já ressaltado. No entanto, um exemplo dramático e excepcional de alteração da estrutura de proteínas acontece no caso do *príon* (o termo inglês *prion* deriva de combinação das iniciais de ***pro****teinaceous* ***in****fectious particle*). Trata-se de uma partícula infecciosa constituída apenas de proteína — diferindo, portanto, dos agentes infecciosos conhecidos que são capazes de se replicar porque contêm DNA ou RNA, como bactérias e vírus —, responsável por moléstias que afetam o sistema nervoso central de mamíferos. Alguns exemplos são a *encefalopatia espongiforme bovina* (popularmente conhecida como a *doença da vaca louca*), uma moléstia semelhante que afeta ovelhas e moléstias humanas de incidência rara, como a doença de Creutzfeldt-Jakob.

A incidência da moléstia em ruminantes atingiu proporções epidêmicas na Inglaterra devido ao hábito de alimentar o gado com rações preparadas com carne e ossos derivados, inadvertidamente, de animais infectados. Estes animais apresentavam parte das moléculas da proteína *PrP* (de ***Pr****ion* ***P****rotein*) com estrutura alterada; esta proteína, na sua forma normal, ocorre no cérebro de animais sadios e sua função ainda é desconhecida. As moléculas modificadas da proteína *PrP* são os príons. Admite-se que o próprio príon induza as alterações estruturais na proteína PrP normal, convertendo-a em novos príons. As mudanças consistem em aumento do conteúdo de folha β pregueada e redução

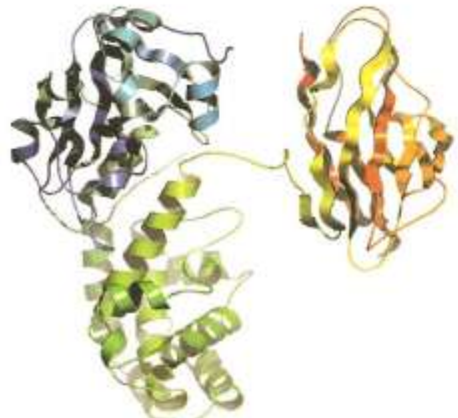


Fig. 2.9 Estrutura da toxina diftérica, que apresenta segmentos em α-hélice, em folha β pregueada e sem estrutura regular.

daquele de α-hélice. As alterações na conformação da proteína modificam a sua solubilidade, provocando a agregação das moléculas e a degeneração do tecido nervoso; resultam os sintomas característicos e a morte do animal portador da moléstia.

A *estrutura terciária* descreve o dobramento final da cadeia polipeptídica por interação de regiões com estrutura regular (α-hélice ou folha β pregueada) ou de regiões sem estrutura definida (Figs. 2.7 a 2.9). Neste nível de organização, segmentos distantes da estrutura primária podem aproximar-se e interagir, por intermédio de ligações não-covalentes entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Estas ligações são consideradas fracas (4-30 kJ · mol^{-1}), quando comparadas a ligações covalentes (200 kJ · mol^{-1}). Como discutido anteriormente para as pontes de hidrogênio da estrutura secundária, é o grande número de ligações individualmente fracas que permite a manutenção dos dobramentos da estrutura terciária das proteínas. Estas ligações podem ser de diferentes tipos (Fig. 2.10):

1. *Pontes de hidrogênio* — estabelecidas entre grupos R de aminoácidos polares com ou sem carga. Por exemplo, serina e treonina, que apresentam grupo hidroxila, podem formar ponte de hidrogênio com asparagina ou glutamina, que apresentam grupo carbonila. As pontes de hidrogênio da estrutura terciária, naturalmente, não apresentam um padrão regular de disposição, ao contrário do que ocorre com as pontes de hidrogênio da estrutura secundária, com as quais não devem ser confundidas.
2. *Interações hidrofóbicas* — formadas entre as cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos apolares. Estas cadeias não interagem com a água e aproximam-se, reduzindo a área apolar exposta ao solvente. As interações hidrofóbicas não resultam de qualquer atração entre os grupos apolares, mas são conseqüência da presença da molécula proteica no ambiente aquoso celular. Naturalmente, a maioria das cadeias hidrofóbicas localizam-se no interior apolar da molécula proteica. As interações hidrofóbicas são as mais importantes para a manutenção da conformação espacial das proteínas, dado o grande número (oito) de aminoácidos hidrofóbicos.
3. *Ligações iônicas* ou *salinas* — incluem-se, nesta categoria, interações de grupos com cargas opostas, como os presentes nos aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) e ácidos (aspartato e glutamato). A energia de formação das ligações iônicas tem magnitude semelhante à das ligações dos grupos iônicos com a água, não contribuindo, portanto, para a conformação da molécula proteica quando estão localizados na sua superfície. Estas ligações, entretanto, têm importância fundamental para o dobramento da cadeia polipeptídica quando ocorrem no interior apolar da proteína. Todavia, esta situação não é muito freqüente: a maioria dos grupos carregados de uma proteína localizam-se em sua superfície, estabelecendo interações íon-dipolo com a água, que forma uma camada organizada em volta da molécula proteica, a *camada de solvatação*.

Além das ligações não-covalentes já descritas, a estrutura proteica pode ser estabilizada por uma ligação covalente, a *ponte dissulfeto* (−S−S−); ela é formada, entre dois resíduos de cisteína, por uma reação de oxidação catalisada por

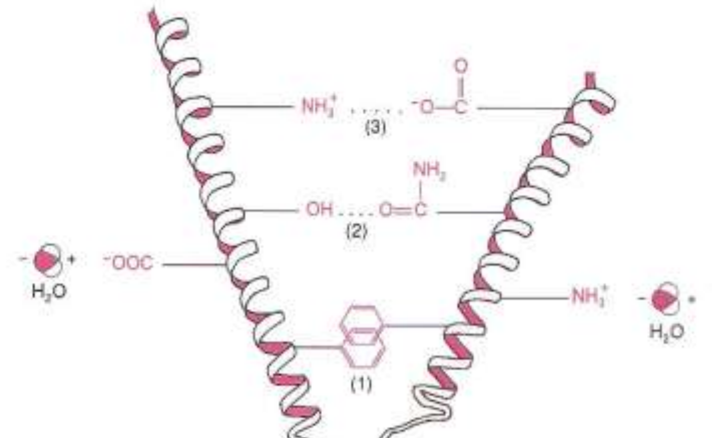


Fig. 2.10 Esquema de um "cotovelo" da estrutura terciária de uma proteína globular, formado devido à interrupção de dois segmentos em α-hélice e estabilizado por ligações não-covalentes: interação hidrofóbica (1), ponte de H (2) e ligação iônica (3). Estão mostradas, ainda, as ligações iônicas entre grupos R com carga e dipolos da água.



Fig. 2.11 A estrutura quaternária da hemoglobina consiste na associação de duas cadeias α e duas cadeias β, cada uma associada a um grupo heme (em vermelho).

enzimas específicas. Pontes dissulfeto são raramente encontradas em proteínas intracelulares, sendo mais freqüentes em proteínas secretadas para o meio extracelular. Este é o caso da insulina, que apresenta três pontes dissulfeto (Fig. 19.10, Seção 19.4).

A *estrutura quaternária* descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades) para compor uma proteína funcional. A estrutura quaternária é mantida por ligações não-covalentes entre as subunidades, dos mesmos tipos que mantêm a estrutura terciária. As subunidades que constituem uma proteína podem ser iguais ou diferentes. A molécula de *hemoglobina*, por exemplo, é formada por quatro cadeias polipeptídicas, iguais duas a duas, chamadas α e β, associadas sobretudo por interações hidrofóbicas, com contribuição menor de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas (Fig. 2.11).

Os diferentes níveis de organização estrutural descritos nesta seção são encontrados nas proteínas globulares.

A estrutura terciária pode conter domínios

Muitas vezes, podem-se distinguir na estrutura terciária de uma proteína monomérica, ou na estrutura terciária das subunidades componentes de uma proteína oligomérica, regiões diferenciadas, denominadas *domínios*. Cada domínio tem uma organização espacial compacta, com o interior hidrofóbico e a superfície polar. Geralmente, cadeias polipeptídicas longas (com mais de 200 resíduos de aminoácidos) são as que se dobram em dois ou mais domínios. O grau de interação entre domínios pode variar desde domínios relativamente independentes, ligados por um segmento flexível da cadeia polipeptídica, até aqueles que estabelecem um contato muito íntimo, separados apenas por uma fenda estreita. Em qualquer um dos casos, os domínios podem movimentar-se, uns em relação aos outros. Esta flexibilidade é fundamental para que a molécula de proteína possa ligar-se eficientemente a outros compostos. Por exemplo, em muitas enzimas, a ligação com a molécula de substrato ocorre em fendas situadas entre domínios; estes aproximam-se, encaixando o substrato na molécula da enzima (Fig. 5.4, Seção 5.1). Os domínios de uma proteína com diversas funções podem estar associados, cada um, com uma função diferente.

2.5 PROTEÍNAS GLOBULARES E FIBROSAS

As proteínas são chamadas de globulares ou fibrosas, segundo sua forma. As *proteínas globulares* apresentam uma ou mais cadeias polipeptídicas organizadas em uma forma final aproximadamente esférica. São geralmente solúveis e desempenham várias funções dinâmicas, exemplificadas no início deste capítulo.

As *proteínas fibrosas* têm forma alongada, são geralmente insolúveis e desempenham um papel basicamente estrutural nos sistemas biológicos. Diferentemente das globulares, são formadas pela associação de módulos repetitivos, possibilitando a construção de grandes estruturas. O componente fundamental das proteínas fibrosas são cadeias polipeptídicas muito longas com estrutura secundária regular: α-hélice nas α-queratinas, folha β pregueada nas β-queratinas e uma hélice característica no colágeno.

Nas *α-queratinas*, duas ou três cadeias em α-hélice associam-se lateralmente, formando longos cabos helicoidais, que, reunidos, formam fibrilas e fibras. As α-queratinas são o componente principal da epiderme dos vertebrados e de estruturas relacionadas, como cabelo, lã, chifres, unhas, cascos, bicos e penas. Nestas proteínas, é freqüente a formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína de cadeias polipeptídicas ou fibrilas adjacentes, conferindo grande resistência às fibras. O padrão de distribuição dessas pontes determina o grau de ondulação do cabelo e da

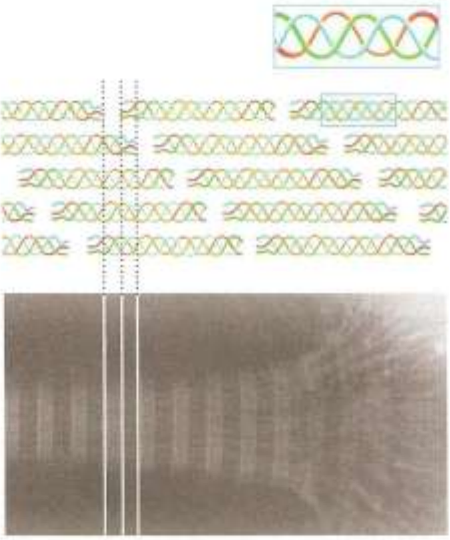


Fig. 2.12 Associação de moléculas de tropocolágeno para formar fibrilas de colágeno: as moléculas ficam deslocadas umas em relação às outras, o que atribui, à fibrila de colágeno, um aspecto estriado ao microscópio eletrônico. As ligações covalentes que estabilizam o colágeno foram omitidas.

lã. A tropomiosina, uma proteína componente das miofibrilas, também é formada por associação de cadeias polipeptídicas em α-hélice.

Nas *β-queratinas*, as fibras são formadas por empilhamento de folhas β pregueadas, como acontece na fibroína da seda e das teias de aranha.

No caso do *colágeno*, as cadeias polipeptídicas apresentam uma conformação helicoidal típica, derivada da sua composição peculiar em aminoácidos — alto conteúdo de glicina, prolina e hidroxiprolina, um aminoácido derivado de prolina — e da grande regularidade na estrutura primária, sendo freqüente a seqüência glicina-prolina-hidroxiprolina. Estas características, diferentes da maioria das proteínas, permitem a associação íntima de três cadeias, que formam uma hélice tripla, o *tropocolágeno*, o módulo estrutural básico do colágeno. As moléculas de tropocolágeno associam-se, formando as fibrilas de colágeno, que são estabilizadas por ligações covalentes entre as cadeias componentes do tropocolágeno e entre moléculas de tropocolágeno adjacentes (Fig. 2.12). O colágeno é a molécula mais abundante dos vertebrados. Suas fibras são responsáveis pelas funções mecânicas e de sustentação do tecido conjuntivo, que se distribui por cartilagens, tendões, matriz óssea e pele; mantém, ainda, a estrutura e a elasticidade do sistema vascular e de todos os órgãos. O número de ligações covalentes do colágeno varia conforme a atividade fisiológica do tecido considerado e aumenta com a idade do animal (o que explica a maior rigidez da carne de animais mais velhos). A estrutura do colágeno é rompida por aquecimento, originando uma proteína desenrolada, mais solúvel, a *gelatina*. Este é o princípio da fabricação industrial desta proteína, muito freqüente na dieta humana. O valor nutricional da gelatina será analisado no Capítulo 18.

2.6 PROTEÍNAS CONJUGADAS

As proteínas podem apresentar aminoácidos modificados ou componentes não-proteicos

Muitas proteínas contêm resíduos de determinados aminoácidos modificados, além dos 20 usuais. Esses aminoácidos exóticos formam-se por alteração enzimática de aminoácidos comuns, após incorporação na cadeia polipeptídica, durante a síntese da proteína.

No colágeno, como já mencionado, é freqüente a hidroxilação da cadeia lateral de prolina. A reação enzimática que produz esta modificação requer a presença de *ácido ascórbico (vitamina C)*. No homem, a deficiência de ácido ascórbico na dieta causa o *escorbuto*. As manifestações clínicas desta doença correlacionam-se com a síntese de moléculas de colágeno menos estáveis e com a sua distribuição nos tecidos: interrupção do crescimento dos ossos em crianças, má cicatrização de ferimentos e aumento da fragilidade de vasos sangüíneos, resultando em hemorragias na pele e gengivas, principalmente.

Em outras proteínas, pode ocorrer acetilação do grupo amino de lisina ou fosforilação do grupo hidroxila de serina, treonina e tirosina. A adição e a remoção de grupos fosfato é um fenômeno cíclico freqüentemente encontrado em proteínas com função enzimática. A fosforilação altera profundamente a atividade destas enzimas (ver Regulação por modificação covalente, Seção 19.2.2).

As proteínas podem, ainda, apresentar moléculas orgânicas não-proteicas, ligadas à cadeia polipeptídica. Estes componentes são designados *grupos prostéticos* e as proteínas, neste caso, são chamadas *proteínas conjugadas*. O grupo prostético é de natureza variável, podendo ligar-se à cadeia polipeptídica covalente ou não-covalentemente. Na mioglobina (Fig. 2.7), a cadeia polipeptídica liga-se não-covalentemente a um grupo prostético chamado *heme*, o mesmo acontecendo com cada uma das quatro cadeias da hemoglobina (Fig. 2.11); a estrutura do grupo heme será descrita no Capítulo 3. O grupo prostético pode ser um carboidrato ou um lipídio, covalentemente ligados, e a proteína conjugada chama-se glicoproteína ou lipoproteína, respectivamente.

Glicoproteínas são encontradas em todos os compartimentos celulares, mas constituem, principalmente, as proteínas secretadas pelas células e aquelas localizadas na sua superfície externa. Exemplos de glicoproteínas secretadas são as mucinas das secreções mucosas e muitas proteínas do sangue, como as que participam da coagulação sangüínea e as imunoglobulinas. As glicoproteínas da membrana plasmática funcionam como marcadores biológicos, que permitem a comunicação entre as células. Proteínas estruturais importantes como o colágeno contêm carboidratos; o interferon e alguns hormônios também são glicoproteínas.

A própria hemoglobina pode ligar-se à glicose, formando a *hemoglobina glicosilada* (HbA_{1c}); a reação de glicosilação é não-enzimática. A concentração de HbA_{1c} aumenta quando a concentração de glicose no sangue (*glicemia*) é anormalmente elevada. Esta condição (*hiperglicemia*) ocorre em pacientes com diabetes (Seção 21.4).

Quanto às *lipoproteínas*, deve-se distinguir entre proteínas que apresentam algumas moléculas de lipídios covalentemente ligados das chamadas lipoproteínas plasmáticas. As primeiras são proteínas conjugadas no sentido estrito, como, por exemplo, as lipoproteínas da parede celular de certas bactérias que contêm moléculas de ácidos graxos unidos por ligações covalentes. Por outro lado, as lipoproteínas plasmáticas (Capítulo 6) são partículas de alto peso molecular, formadas por inúmeras moléculas de lipídios e algumas poucas moléculas de proteína, associadas por ligações não-covalentes. Estas partículas atuam no transporte de lipídios pelo sangue, que será analisado na Seção 20.8.

2.7 CARGA ELÉTRICA E SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS

O valor do pI de uma proteína reflete a sua composição em aminoácidos

A carga elétrica total de uma proteína é o somatório das cargas apresentadas pelos radicais dos aminoácidos que a compõem. A carga destes radicais depende, por sua vez, do valor de seu pK_a e do pH da solução. Para cada proteína existe um determinado valor de pH — chamado *ponto isoelétrico (pI)* — no qual o número de cargas positivas equivale ao número de cargas negativas. Neste pH, a molécula é eletricamente neutra. O pI de proteínas, diferentemente do pI dos aminoácidos, não pode ser calculado a partir dos valores de pK_a dos aminoácidos componentes, devido ao seu grande número e, principalmente, porque o valor de pK_a dos aminoácidos varia conforme a sua localização na estrutura da proteína (Tabela 2.1). O pI das proteínas é determinado experimentalmente: é o valor de pH no qual elas não migram, quando submetidas a um campo elétrico (ver Eletroforese, Seção 2.10.2).

As proteínas exibem valores de pI característicos que refletem a proporção entre aminoácidos ácidos e básicos em sua composição (Tabela 2.5). De fato, para a pepsina, por exemplo, que tem muito mais aminoácidos ácidos (28%) que aminoácidos básicos (2%), a equivalência de cargas será obtida quando a grande maioria dos aminoácidos ácidos estiverem protonados (sem carga) e apenas uma pequena fração desprotonada (com carga negativa), que compensará a carga positiva dos aminoácidos básicos. Esta situação é encontrada em um valor de pH muito ácido (pI = 1). No caso do citocromo *c*, cuja porcentagem de aminoácidos básicos é aproximadamente o dobro daquela de aminoácidos ácidos, o pI corresponde ao valor de pH em que cerca da metade dos aminoácidos básicos estão desprotonados, ou seja, um pH alcalino (pI = 10,6). Proteínas com pI maior que 7 são chamadas de *proteínas básicas* e aquelas com pI menor que 7, de *proteínas ácidas*.

O pI é, portanto, um pH em que a proteína apresenta o mesmo número de grupos ácidos desprotonados e grupos básicos protonados. O abaixamento de pH resulta sempre em aumento da carga positiva da proteína, por ganho efetivo de carga positiva (protonação de grupamentos básicos) ou perda de carga negativa (protonação de grupamentos ácidos); portanto, em pH menor do que o pI, a proteína apresenta uma carga líquida positiva, tanto maior quanto mais afastado do pI for o pH. Por um raciocínio análogo, conclui-se que, acima do pI, a proteína apresenta

Tabela 2.5 Ponto isoelétrico (pI) de algumas proteínas e sua composição em aminoácidos ácidos e básicos

		Aminoácidos (%)					
		Ácidos		Básicos			Ácidos/Básicos
	pI	Asp	Glu	Arg	His	Lys	
Pepsina	1,0	16,6	11,3	1,0	0,5	0,4	15
Albumina	4,8	10,4	17,4	6,2	3,5	12,3	1,3
Mioglobina	7,0	4,7	8,3	1,9	7,5	12,8	0,6
Citocromo c	10,6	3,6	5,9	2,2	2,5	15,2	0,5

carga negativa (grupos ácidos desprotonados adquirem carga negativa e grupos básicos desprotonados perdem carga positiva).

A solubilidade das proteínas é influenciada pela composição do meio aquoso

A solubilidade das proteínas é determinada, fundamentalmente, pela estrutura primária, que define a relação espacial entre os aminoácidos na estrutura tridimensional e sua interação com a água. Por outro lado, características do meio, tais como o pH, a concentração de sais e a constante dielétrica do solvente, interferem na solubilidade.

A variação da carga líquida de uma proteína tem implicações na sua solubilidade. No pI a solubilidade é menor do que em outros valores de pH, nos quais as moléculas têm todas a mesma carga e se repelem eletrostaticamente, estabilizando-se em solução (Fig. 2.13).

As proteínas apresentam também alteração da solubilidade em função da concentração de sais. Muitas proteínas globulares são insolúveis em água e tornam-se cada vez mais solúveis conforme se aumenta a adição de sal (Fig. 2.13), até certas concentrações limitantes, que dependem da proteína e do tipo de sal escolhido (trecho ascendente da curva da Fig. 2.14). Este fenômeno é chamado *"salting in"*. Acredita-se que os íons adicionais (positivos e negativos), presentes em solução, interagem com os grupos carregados das moléculas de proteína, atenuando a interação entre elas. Deste modo, o efeito eletrostático de íons em soluções salinas diluídas é um fator adicional para o aumento da

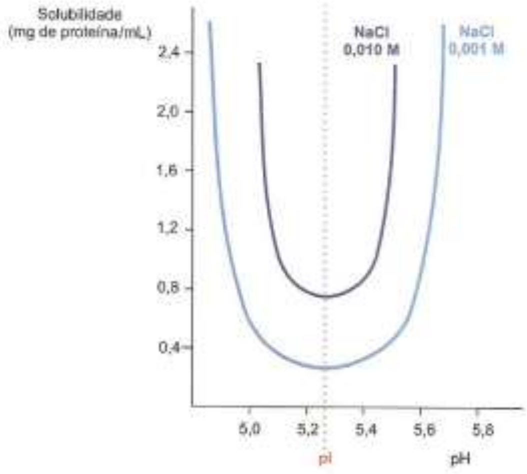


Fig. 2.13 Solubilidade de uma proteína globular em função do pH, em duas concentrações de NaCl. Está assinalado o pH correspondente ao pI da proteína.

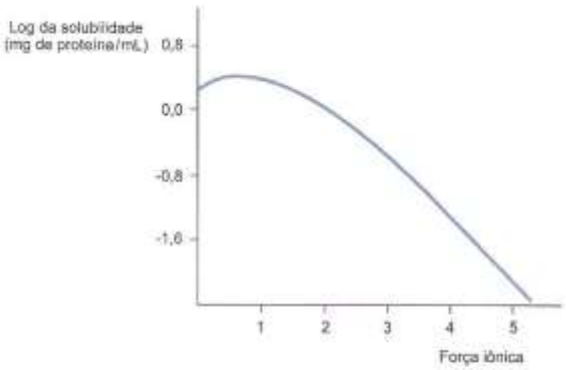


Fig. 2.14 Solubilidade da hemoglobina eqüina, em função da concentração de $(NH_4)_2SO_4$, expressa em termos da força iônica da solução.

solubilidade das proteínas, além da sua camada de solvatação. Por outro lado, quando a concentração de sal atinge valores muito elevados, a solubilidade das proteínas diminui (trecho descendente da curva da Fig. 2.14), até sua precipitação. Este efeito, chamado de *"salting out"*, ocorre com sais di- ou trivalentes, que competem com a proteína por moléculas de água para solvatação. Em altas concentrações desses sais há tantos íons solvatados, que a quantidade de água disponível torna-se insuficiente para dissolver todos os solutos: as interações proteína-proteína tornam-se mais fortes que as interações proteína-solvente, a proteína sofre agregação e precipita. Como cada proteína precipita em uma concentração salina característica, o *salting out* pode ser empregado para separar proteínas. De fato, esta técnica costuma ser a etapa inicial de processos de purificação de proteínas. O sal mais utilizado é o sulfato de amônio — $(NH_4)_2SO_4$ — devido à sua alta solubilidade, que permite obter soluções muito concentradas; além disso, este sal, por razões desconhecidas, estabiliza a estrutura nativa das proteínas, possibilitando que elas precipitem sem sofrer desnaturação.

Solventes orgânicos solúveis em água, como acetona e etanol, diminuem a solubilidade das proteínas, devido ao baixo valor de suas constantes dielétricas e porque eles também sofrem hidratação. Em soluções aquosas desses compostos, moléculas contendo grupos com carga, como as proteínas, sofrem menor hidratação e interagem tão fortemente que precipitam. Procedimentos experimentais que utilizam a adição de solventes orgânicos para precipitar proteínas devem ser realizados a 0°C, porque, em temperaturas mais altas, eles provocam a desnaturação das proteínas.

2.8 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS

A desnaturação de proteínas acarreta a perda de sua estrutura original

Quando uma proteína é sintetizada na célula, sua estrutura primária dobra-se espontaneamente, originando as estruturas secundária e terciária. Se a proteína em questão possuir estrutura quaternária, esta também se organiza espontaneamente, assim que a estrutura terciária das subunidades componentes é formada. A proteína assume a conformação denominada *nativa*. Esta é a conformação mais estável que a molécula pode assumir naquelas condições e reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula proteica e entre esta e seu meio ambiente.

Ao proceder-se ao isolamento e à purificação de uma proteína, a partir das células onde ela é encontrada, são introduzidas alterações físicas e químicas no seu meio ambiente que podem afetar sua estrutura espacial a ponto de ocasionar a perda de sua função biológica. A proteína é dita, então, *desnaturada*: sua conformação nativa é destruída devido à quebra de ligações não-covalentes (as ligações peptídicas são mantidas), e o resultado é uma cadeia polipeptídica distendida.

A desnaturação pode ser provocada, experimentalmente, por vários tipos de tratamento que ocasionam o rompimento de ligações não-covalentes. Um exemplo é o aquecimento da proteína, sendo que a temperatura de desnaturação da maioria das proteínas situa-se abaixo de 100°C. Há exceções, como as proteínas de *bactérias termofílicas* que habitam fontes térmicas, onde as temperaturas são próximas de 100°C. Uma destas proteínas, a DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*, a Taq polimerase, tem sido amplamente empregada em técnicas de engenharia genética — graças à sua estabilidade térmica, mantém-se ativa a 95°C, temperatura em que as fitas de DNA separam-se, e pode, portanto, duplicá-las. Um fato curioso é que a estrutura espacial dessas proteínas termoestáveis apresentam apenas diferenças sutis em relação à estrutura de proteínas com estabilidade térmica normal. Outros agentes desnaturantes são os ácidos e álcalis fortes: valores de pH muito baixos ou muito altos, afetando a ionização dos grupamentos da proteína, conferem à molécula uma elevada carga positiva (ou negativa), ocasionando repulsão intramolecular, com exposição do interior hidrofóbico. A adição de solventes orgânicos polares e de compostos com grande capacidade de formar pontes de hidrogênio (uréia) determina a desnaturação da proteína porque estes últimos agentes estabelecem pontes de hidrogênio com radicais da proteína, substituindo ligações que mantinham a estrutura nativa, e os solventes orgânicos por diminuírem a constante dielétrica do meio. A desnaturação também pode ser ocasionada por detergentes e sabões, que são compostos anfipáticos, ou seja, apresentam uma cadeia longa apolar, ligada a um grupo terminal carregado. Estes agentes são desnaturantes porque sua cauda hidrofóbica se introduz no interior da molécula proteica e se associa com radicais apolares, rompendo interações hidrofóbicas que mantêm a estrutura nativa. Um detergente freqüentemente empregado é o dodecil sulfato de sódio (SDS) (Fig. 2.15).

A desnaturação pode ser irreversível: algumas proteínas, quando desnaturadas, tornam-se insolúveis. É o caso da albumina do ovo, quando aquecida, e da caseína, quando o leite é acidificado, por exemplo, por crescimento bacteriano.

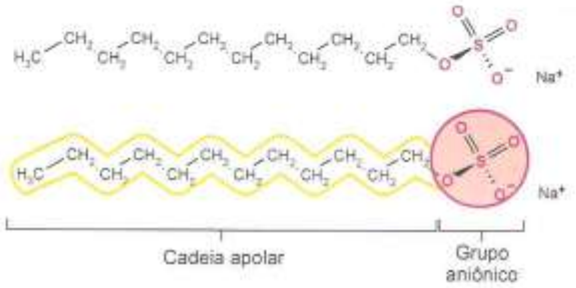


Fig. 2.15 Fórmula estrutural do detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) e esquema ilustrando sua natureza anfipática.

Proteínas desnaturadas podem renaturar

Retiradas as condições desnaturantes, muitas proteínas podem reassumir sua conformação nativa — este processo chama-se *renaturação*. A renaturação demonstra que a estrutura tridimensional de uma proteína é conseqüência de sua estrutura primária, ou seja, é determinada, unicamente, por sua seqüência de aminoácidos.

Durante muito tempo, admitiu-se que o processo de enovelamento da cadeia polipeptídica recém-sintetizada nos ribossomos era autônomo, não requerendo nenhum fator adicional, nem fornecimento de energia. Esta visão passou a ser questionada diante da constatação que a velocidade e a eficiência da renaturação *in vitro* são muito menores do que *in vivo*. Realmente, na década de 1990, demonstrou-se que as células dispõem de um aparato muito eficiente para assessorar a proteína durante a "montagem" de sua estrutura nativa. Este aparato é constituído por vários tipos de proteínas denominadas conjuntamente *chaperonas*[3], que se ligam a proteínas nascentes, impedindo ou revertendo interações inadequadas entre regiões potencialmente complementares.

As proteínas assessoras possibilitam, ainda, a estabilização de proteínas em condições desfavoráveis — que ocasionam mudanças de conformação e agregação das moléculas — como, por exemplo, altas temperaturas, hipóxia, exposição a radicais livres etc. As chaperonas mais bem estudadas são proteínas bacterianas de choque térmico, *Hsp* (de *Heat shock protein*), induzidas quando as células são submetidas a altas temperaturas.

O mecanismo de ação das chaperonas ainda não está totalmente elucidado. Algumas classes dessas proteínas organizam-se em grandes complexos, formados por várias moléculas de chaperonas diferentes. Basicamente, eles recuperam a estrutura nativa de proteínas parcialmente desnaturadas por meio de etapas cíclicas, sustentadas por hidrólise de ATP. Uma molécula de proteína desnaturada (o substrato) liga-se ao complexo e é transferida para uma cavidade no interior do complexo, que constitui um microambiente propício ao seu dobramento correto; segue-se a liberação da proteína, agora com conformação nativa, para o meio.

As proteínas assessoras são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas desde em bactérias até em mamíferos. Distúrbios no processo de enovelamento da cadeia proteica, e a conseqüente agregação de moléculas, estão envolvidos em diversas condições patológicas, tais como: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doenças causadas por príons (Seção 2.4) e outras doenças neurodegenerativas, infecções, câncer etc.

A substituição de aminoácidos pode alterar a função das proteínas

A desnaturação, como descrito anteriormente, é o rompimento da estrutura nativa, que leva à perda da função da proteína. Todavia, alterações menos drásticas da estrutura da proteína podem inativá-la. Uma mutação que resulte na substituição de um aminoácido em uma posição crítica na molécula da proteína pode ter conseqüências danosas para o desempenho da sua função. O exemplo clássico é a substituição, nas cadeias β da hemoglobina, de um resíduo de glutamato, cujo radical polar negativo localiza-se na superfície externa da molécula, por valina, com grupo R apolar. As moléculas da hemoglobina substituída, quando desoxigenadas, agregam-se devido a ligações hidrofóbicas envolvendo os radicais apolares de valina. Os agregados formam um precipitado fibroso que distorce as hemácias, que adquirem forma de foice — *sickle*, em inglês — e, por isso, a hemoglobina alterada é chamada de *hemoglobina S*, em contraposi-

[3]Denominação originada do termo francês *chaperon*, utilizado para designar uma senhora que, antigamente, acompanhava e vigiava moças solteiras.

ção à hemoglobina normal, a *hemoglobina A*. Estas células deformadas obstruem os capilares, impedindo a oxigenação adequada dos tecidos; também são mais frágeis que as normais, ocasionando anemia grave. A doença é conhecida como *anemia falciforme*, e manifesta-se somente quando a mutação ocorre em homozigose: indivíduos heterozigotos são normais. Hemoglobinas mutantes serão ainda analisadas no próximo capítulo.

2.9 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS — ESTRATÉGIA GERAL

A purificação de uma proteína inicia-se com a liberação da proteína do material biológico onde ela ocorre — órgãos, tecidos ou células isoladas como hemácias, bactérias e leveduras — pelo rompimento destas estruturas, que pode ser obtido por metodologias diversas. A homogenização mecânica em meio isotônico, por exemplo, produz o maceramento dos tecidos (ou órgãos) e a lise das células, originando um *extrato celular*, constituído por pedaços de membrana plasmática, organelas (núcleos, mitocôndrias etc.) e o citossol. Os diversos componentes celulares podem ser separados por um procedimento denominado *fracionamento celular*, que consiste em centrifugar o extrato celular em velocidades progressivamente maiores. Geralmente, quanto menor for uma estrutura, maior será a força centrífuga necessária para sedimentá-la; como os componentes celulares diferem em tamanho, eles sedimentarão em velocidades diferentes, podendo, assim, ser separados uns dos outros. Quando a proteína desejada localiza-se apenas em uma das frações obtidas — mitocôndrias, por exemplo — o fracionamento celular propicia uma purificação inicial considerável.

Uma vez conseguida uma preparação contendo a proteína, esta pode ser separada de outras proteínas e de outros tipos de moléculas por métodos que se baseiam em propriedades características, tais como: solubilidade, tamanho, carga elétrica e afinidade por determinados compostos. O método de purificação a ser escolhido dependerá da particular proteína que se pretende isolar e, usualmente, empregam-se combinações seqüenciais de diferentes métodos. Freqüentemente, o primeiro passo empregado para a separação de proteínas de extratos brutos é a precipitação por adição de sais (sulfato de amônio) ou solventes orgânicos miscíveis com água — a separação, neste caso, baseia-se em diferenças de solubilidade apresentadas pelas proteínas. Todavia, estas técnicas permitem apenas uma purificação parcial e devem ser seguidas de outras, mais seletivas, como cromatografia e eletroforese. A purificação da proteína deve ser monitorada ao longo das diferentes etapas de separação, e para isso é necessário dispor de um método que permita detectar e quantificar unicamente a proteína de interesse. Esta situação será exemplificada no Capítulo 5, com a purificação de uma enzima.

A estratégia descrita para o isolamento de proteínas aplica-se, basicamente, à purificação de muitas outras moléculas biológicas.

Atualmente, proteínas podem ser obtidas por um caminho totalmente diferente, graças ao desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante. O gene que codifica a proteína desejada pode ser isolado das células de origem e expresso em organismos com crescimento rápido, como bactérias e leveduras. Muitas vezes, a proteína heteróloga, que na célula original ocorria em concentrações da ordem de 0,002%, passa a representar de 30 a 40% do conteúdo proteico das células recombinantes. Obviamente, esta alta concentração facilita muito o isolamento da proteína.

2.10 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

2.10.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Na *cromatografia em coluna*, uma amostra da mistura de proteínas é aplicada no topo de uma coluna formada por uma matriz hidratada, que pode ser constituída de diversos tipos de materiais, denominados conjuntamente *resinas*. A coluna é, então, eluída (lavada) com uma solução apropriada para a separação da proteína de interesse. As diferentes proteínas migrarão através da coluna com velocidades diferentes que dependerão do grau de interação com a matriz, o que permite a sua separação. Os vários métodos de cromatografia em coluna disponíveis diferem quanto à matriz utilizada e são classificados de acordo com a propriedade das proteínas que é discriminada pela matriz: tamanho (cromatografia de exclusão), carga iônica (cromatografia de troca iônica) e especificidade de ligação (cromatografia de afinidade).

Cromatografia de exclusão (filtração em gel)

A *cromatografia de exclusão*, também chamada de *cromatografia por filtração em gel*, separa moléculas que diferem quanto ao tamanho, como acontece com as proteínas, cuja massa molar varia de alguns milhares (5.733 para insulina) a milhões (2.800.000 para hemocianina, uma proteína transportadora de oxigênio de certos invertebrados). A matriz, nesta técnica, é um gel constituído por esferas com poros de tamanho definido. As moléculas menores do que o diâmetro dos poros podem penetrar nas esferas, ao passo que as maiores, não: são "excluídas". Deste modo, as moléculas menores percor-

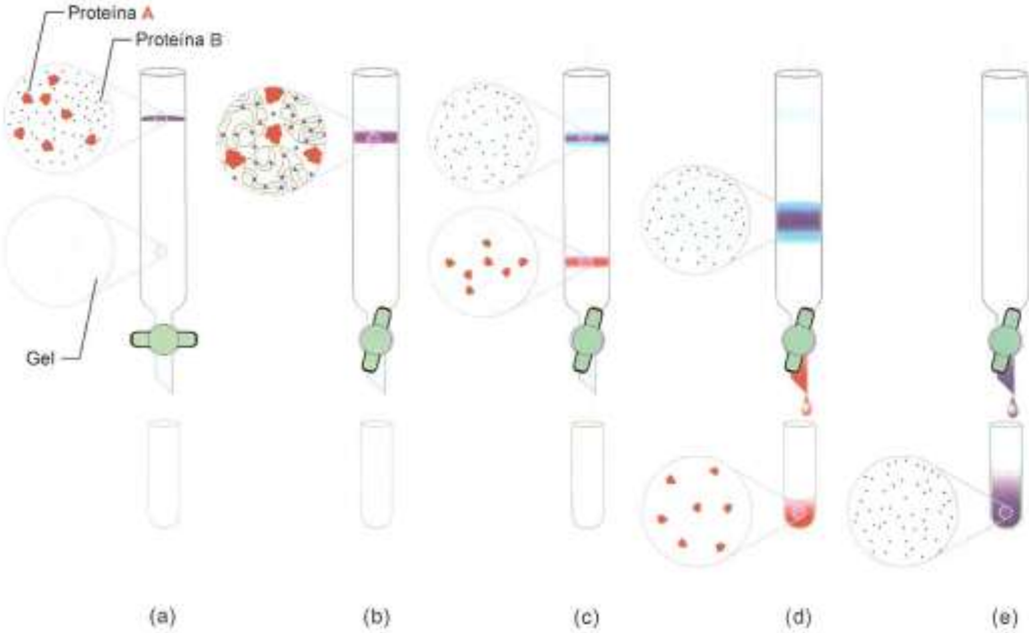


Fig. 2.16 Filtração em gel. Uma mistura formada por duas proteínas (A e B), com massas molares diferentes, é aplicada sobre uma coluna de gel formado por esferas porosas (a). As moléculas da proteína menor (proteína A) podem penetrar nos poros das esferas (b), percorrendo a coluna mais lentamente (c); a proteína maior (proteína B) é, então, eluída primeiramente (d), e a proteína menor, depois (e).

rem, ao longo de uma coluna com esse material, um trajeto muito maior do que as moléculas maiores, que sairão da coluna em primeiro lugar (Fig. 2.16). Um material comumente empregado para a fabricação de géis cromatográficos é *dextrana*, um polímero de glicose, comercialmente disponível com o nome de *Sephadex*; este produto é sintetizado com diversos tamanhos de poros, permitindo a exclusão de moléculas com um largo intervalo de massa molar.

A filtração em gel também pode ser empregada para diminuir a concentração de sais de uma solução de proteína, por exemplo quando ela é precipitada por adição de altas concentrações de sulfato de amônio. Para tanto, deve-se fazer a filtração em um gel que exclua a proteína, que será eluída primeiramente. Um outro processo rotineiramente utilizado para separar proteínas de substâncias de baixo peso molecular é a diálise. A *diálise* não é uma técnica cromatográfica, mas é um tipo de filtração molecular. A mistura de proteína e moléculas pequenas é colocada dentro de um saco de material semipermeável, como o celofane (acetato de celulose). Quando o saco de diálise é imerso em tampão, as moléculas proteicas ficam retidas, enquanto as moléculas pequenas ou íons atravessam a membrana de diálise (Fig. 2.17).

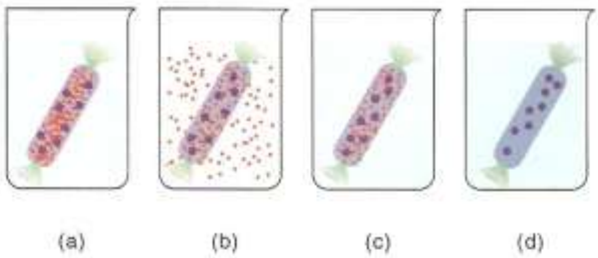


Fig. 2.17 Diálise. O saco de diálise contendo a mistura de proteína (azul) e moléculas pequenas (vermelhas) é imerso em um volume grande de solução tampão (a). Como a membrana semipermeável permite a passagem apenas das moléculas pequenas, sua concentração dentro e fora do saco tende a se igualar (b). Após várias trocas de tampão (c), restam apenas as moléculas de proteína dentro do saco de diálise (d).

Cromatografia de troca iônica

As *resinas de troca iônica* comumente utilizadas para proteínas são formadas por celulose ligada covalentemente a grupos com carga positiva ou negativa (Tabela 2.6). Moléculas com carga de mesmo sinal que a resina são eluídas primeiramente, seguidas por moléculas com carga oposta, em uma ordem definida pela magnitude da carga apresentada pela proteína nas condições da cromatografia. Geralmente, escolhem-se valores de pH e de concentração salina que determinem a ligação da proteína de interesse à resina escolhida; seguem-se alterações dessas condições que levem à eluição da proteína.

Tabela 2.6 Algumas resinas utilizadas para cromatografia de troca iônica de proteínas

Resina	Grupo ionizável
Fosfocelulose	$-PO_3^{2-}$
Carboximetilcelulose	$-CH_2-COO^-$
Dietilaminoetilcelulose	$-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$

Cromatografia de afinidade

Muitas proteínas ligam-se específica e não-covalentemente a determinadas moléculas: enzimas, hormônios e anticorpos ligam-se, respectivamente, a substratos, receptores ou antígenos. Tais proteínas podem ser purificadas por *cromatografia de afinidade*. O princípio do método consiste em ligar a molécula pela qual a proteína tem afinidade (ligante) a uma matriz insolúvel, sendo a mais utilizada a *agarose*, um polímero de açúcares encontrado em algas vermelhas. A mistura de proteínas é passada por uma coluna preparada com esse material: a proteína de interesse fica adsorvida à coluna, graças à interação com o ligante, e as outras proteínas passam livremente. A proteína adsorvida pode ser eluída da coluna por adição de solução concentrada do ligante (Fig. 2.18). Se a proteína for uma enzima, o ligante pode ser o

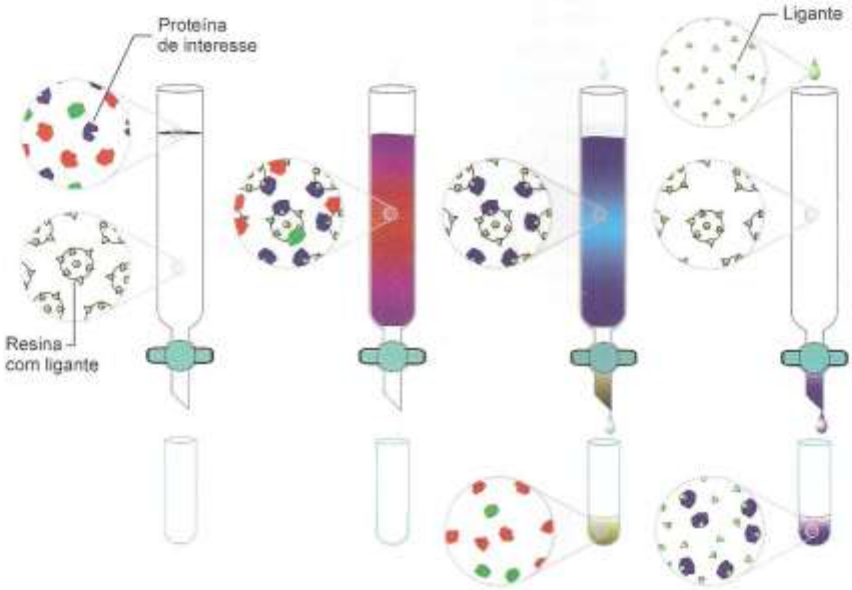


Fig. 2.18 Cromatografia de afinidade. Uma mistura de proteínas (representadas em cores diferentes) é passada através de uma coluna da resina (esferas brancas), contendo um ligante (espículas em verde), pelo qual a proteína de interesse tem afinidade (a); as proteínas percorrem a coluna (b) e somente a proteína de interesse é retida (c); a eluição é feita com uma solução concentrada de ligante, que, competindo com suas moléculas ligadas à matriz, libera a proteína desejada (d).

substrato, o produto ou o inibidor competitivo. No caso de purificação de anticorpos, o ligante utilizado é o antígeno. O receptor de insulina, uma proteína da superfície celular, foi isolado por cromatografia de afinidade em agarose contendo insulina covalentemente ligada. A cromatografia de afinidade tem, obviamente, um poder de resolução muito maior do que os outros métodos cromatográficos (ver Tabela 5.6), embora seja restrita a uma classe especial de proteínas.

2.10.2 ELETROFORESE

Em um mesmo pH, proteínas diferentes apresentarão cargas líquidas diferentes, o que determinará velocidades de migração diferentes, se as proteínas forem submetidas a um campo elétrico. Este é o princípio da *eletroforese*. As diferentes técnicas de eletroforese empregam, invariavelmente, um suporte sólido — como papel ou gel — que evita a mistura das proteínas por convecção e permite utilizar pequenas quantidades de material.

Na *eletroforese em papel*, a amostra é aplicada sobre uma tira de papel ou de acetato de celulose, saturada com solução tampão. As extremidades da tira são imersas em reservatórios distintos contendo tampão, onde ficam os eletrodos (Fig. 2.19). O sistema é submetido a uma diferença de potencial apropriada e as proteínas migram em direção ao pólo de carga oposta, com velocidades proporcionais às suas cargas. Depois que o solvente migrar uma distância adequada, a posição das proteínas é revelada por coloração específica.

A *eletroforese em gel* é um dos métodos mais utilizados para analisar misturas de proteínas ou outras macromoléculas. Os géis utilizados como suporte — agarose e poliacrilamida — podem ser preparados com porosidade variável, propiciando separação das moléculas segundo o seu tamanho, além da sua carga. Proteínas menores migram mais depressa que as maiores, formando uma série de bandas definidas, que podem ser visualizadas por coloração específica (Fig. 2.20). Uma variante desta técnica, conhecida pela sigla *SDS-PAGE*, emprega um gel de poliacrilamida, em presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS, Fig. 2.15). O SDS liga-se a radicais hidrofóbicos das proteínas, causando sua desnaturação. Esta associação, com a maioria das proteínas, segue o mesmo padrão: uma molécula de SDS a cada dois resíduos de aminoácidos. Além disso, cada molécula de detergente ligada atribui uma carga negativa à proteína desnaturada, mascarando a carga intrínseca da molécula nativa. O resultado, qualquer que seja a proteína, é a formação de um complexo com forma alongada, com uma densidade de cargas negativas proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica. Este método, portanto, separa proteínas segundo a sua massa molar. Se a proteína apresentar estrutura quaternária, suas subunidades serão desnaturadas e dissociadas por SDS e a eletroforese determinará o peso molecular de cada uma delas. O emprego da eletroforese em gel, ao longo

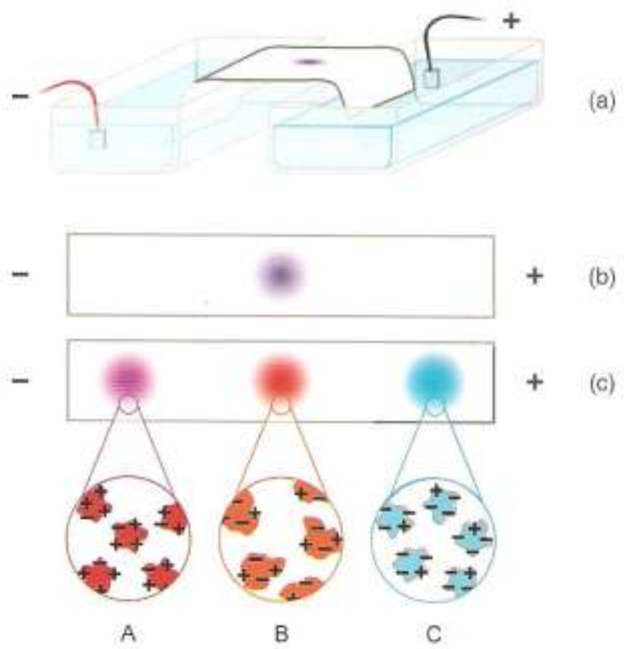


Fig. 2.19 Eletroforese em papel. Uma mistura de três proteínas — A, B e C — é aplicada sobre uma tira de papel ou acetato de celulose, umedecida com tampão. A tira é colocada em um aparato apropriado e um campo elétrico é aplicado ao sistema (a). As proteínas migram de sua posição inicial (b) para os pólos, de acordo com a carga que apresentam no pH do tampão utilizado. Depois de algum tempo, a eletroforese é interrompida e a posição das proteínas é revelada (c).

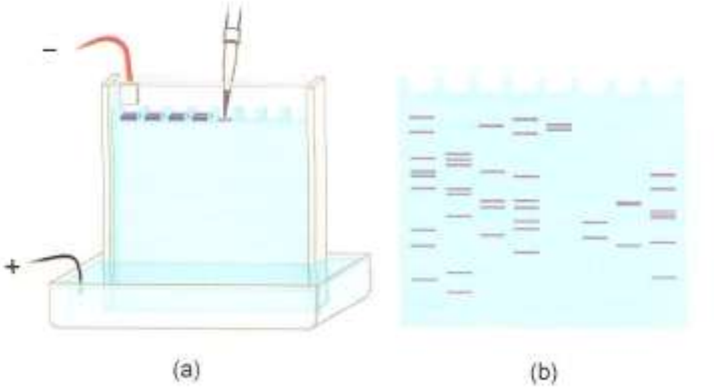


Fig. 2.20 Eletroforese em gel. As amostras são colocadas em pequenas depressões (poços) formadas na parte superior do gel, contido entre placas de plástico e imerso em tampão (a). O aparato é submetido a um campo elétrico e as proteínas migram, formando bandas: quanto menor a massa molar da proteína, maior a distância migrada. Em (b), o resultado obtido, após revelação das bandas formadas no gel por coloração específica para proteínas. Nesta eletroforese, foram utilizadas amostras contendo diferentes misturas de proteínas.

das diferentes etapas de um processo de purificação de proteínas, além de permitir a sua separação, fornece informações adicionais, tais como: o número de proteínas presentes na preparação, a sua massa molar e de quantas subunidades são formadas.

BIBLIOGRAFIA

Boyer RF: *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques*. Benjamin Cummings, 2005.
Creighton TE: *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed. W.H. Freeman & Company, 1993
Frieden E: Non-covalent interactions: key to biological flexibility and specificity. *J Chem Educ* **52**:754-761, 1975
Perutz MF: *Protein Structure. New Approaches to Disease and Therapy*. Freeman, 1992.
Roe S (ed.): *Protein Purification Techniques: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford University Press, 2001.
Solomons TWG, Fryle CB: *Organic Chemistry*, 8th ed. Wiley, 2003.
St George-Hyslop PH, Petit A: Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol* **328** (2):119-130, 2005.
Tinoco I et al: *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Science*, 4th ed. Prentice Hall, 2002.
Weissmann C: The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* **2** (11):861-871, 2004.
Young JC et al: More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* **28** (10):541-547, 2003.

3

Hemoglobina — Transporte de Oxigênio e Tamponamento do Plasma

O metabolismo das células aeróbias depende do recebimento contínuo de oxigênio, usado na oxidação de nutrientes. Por outro lado, o CO_2 resultante dessa oxidação deve ser removido constantemente. Nos organismos em que essas trocas não podem ser feitas diretamente com o meio por simples difusão, de modo eficiente, existem sistemas especializados incumbidos dessa função. Este é o caso dos organismos pluricelulares complexos, como os vertebrados, nos quais esse papel é exercido por elementos componentes do sangue. O transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos é efetuado pela hemoglobina presente nas hemácias. O CO_2 produzido pelos tecidos é convertido a ácido carbônico, que se ioniza em bicarbonato e H^+. O bicarbonato é transportado pelo sangue até os pulmões, onde é eliminado como CO_2; os íons H^+ são removidos pela hemoglobina.

A hemoglobina, além de transportar oxigênio, exerce, portanto, um poderoso efeito tampão, impedindo que os íons H^+ possam alterar o pH do sangue, com conseqüências danosas para o organismo. Deste modo, embora haja grande produção de CO_2 pelos tecidos, a presença da hemoglobina restringe as variações de pH a apenas centésimos de unidades, mantendo o sangue e os tecidos em meio notavelmente constante.

3.1 ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA

As quatro cadeias da hemoglobina associam-se em dímeros

A hemoglobina dos seres humanos adultos (*Hb A*) é formada por quatro subunidades: duas α e duas β. A estrutura terciária dos dois tipos de subunidades é semelhante à da mioglobina (Seção 2.4).

A estrutura quaternária da hemoglobina é mantida por ligações não-covalentes, que são muito mais numerosas entre subunidades diferentes — α/β — do que entre subunidades iguais — α/α e β/β. O resultado dessa associação desigual é uma molécula tetramérica composta pela união de dois dímeros, denominados $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ (Fig. 3.1 a). O contato entre os dois dímeros é estabelecido entre a subunidade α de um dímero e a subunidade β do outro dímero. Esta interação é devida a ligações não-covalentes entre determinados segmentos da cadeia polipeptídica das subunidades α e β, que formam as interfaces designadas $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ (Fig. 3.1 b). *As interfaces entre os dímeros sofrem modificações importantes durante a oxigenação e a desoxigenação da hemoglobina,* como será discutido adiante.

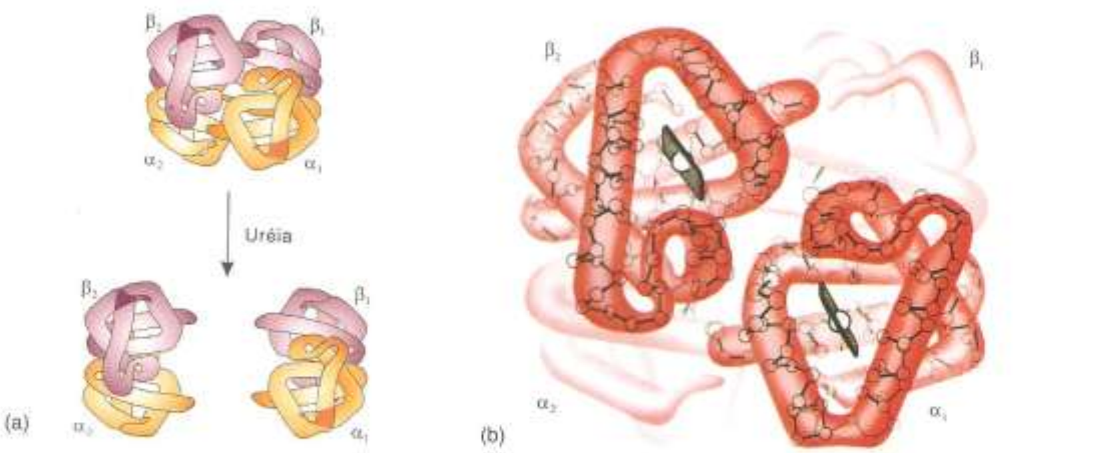


Fig. 3.1 Estrutura quaternária da hemoglobina. a) A associação entre subunidades diferentes é mais forte que entre subunidades iguais: quando a hemoglobina é suspensa em solução concentrada de uréia, o tetrâmero dissocia-se em dímeros $\alpha\beta$; os grupos heme não estão mostrados. b) Esquema enfocando as áreas de contato entre os dímeros, com a interface $\alpha_1\beta_2$ à frente; cada grupo heme fica alojado em um bolsão hidrofóbico.

3.2 MECANISMO DE LIGAÇÃO DO OXIGÊNIO À HEMOGLOBINA

O grupo prostético heme é o sítio de ligação do oxigênio

Cada cadeia da hemoglobina está associada a um grupo prostético chamado *heme*. O heme é uma molécula de porfirina contendo um íon de ferro, que, na mioglobina e na hemoglobina, permanece no estado ferroso, Fe^{2+}. As porfirinas consistem em um anel plano, resultante da ligação de quatro núcleos pirrólicos, que apresentam cadeias laterais variáveis; o tipo de porfirina[1] encontrado na hemoglobina é a protoporfirina IX (Fig. 3.2). O heme confere à hemoglobina, e ao sangue, sua cor característica. Outras proteínas, como a catalase e os citocromos, também contêm heme.

O grupo heme, em cada subunidade, localiza-se dentro de uma cavidade hidrofóbica, delimitada sobretudo por aminoácidos apolares, que estabelecem interações hidrofóbicas com o anel porfirínico. Este ambiente apolar torna possível a ligação do oxigênio ao ferro (Fe^{2+}), sem que ele seja oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}).

O íon de ferro fica no centro do grupo heme, formando seis ligações: liga-se aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico, à cadeia polipeptídica — em um resíduo de histidina, a His 87, chamada de *histidina proximal* — e pode, ainda, ligar-se reversivelmente a uma molécula de oxigênio (O_2). Estas duas últimas ligações são perpendiculares ao plano do anel, situando-se em lados opostos do plano do heme (Fig. 3.2). Ao sítio de ligação do ferro com oxigênio, aparentemente tão específico, podem ligar-se, ainda, outras moléculas pequenas, como CO e H_2S, com afinidade ainda maior que o oxigênio, que é, portanto, excluído. Estes compostos ligam-se ao ferro do grupo heme de mioglobina, hemoglobina e citocromos, o que explica sua alta toxidez para organismos aeróbios.

Uma molécula de hemoglobina totalmente oxigenada contém, portanto, quatro moléculas de O_2 e é denominada *oxiemoglobina (oxi-Hb ou HbO_2)*, em contraposição à forma desprovida de oxigênio, chamada *desoxiemoglobina (desoxi-Hb ou Hb)*. A ligação do oxigênio ao grupo heme altera a cor da hemoglobina, que passa de azulada (sangue venoso) a vermelha (sangue arterial).

A ligação com oxigênio desencadeia alterações na conformação da hemoglobina

As hemoglobinas oxigenada e desoxigenada têm estruturas tão diferentes que apresentam formas cristalinas distintas. A oxigenação não afeta a interação entre as subunidades que compõem os dímeros, provavelmente devido ao

---

[1] A nomenclatura das porfirinas adota um prefixo que se refere ao número de tipos diferentes de cadeias laterais ligadas aos núcleos pirrólicos — no caso do prefixo *proto*, são três: metila, propionila e vinila — e um algarismo romano que indica o isômero resultante dos diferentes arranjos possíveis dos substituintes ao redor do anel tetrapirrólico. Nas protoporfirinas podem formar-se 15 isômeros (I a XV), mas somente a *protoporfirina IX* é sintetizada pelos seres vivos.

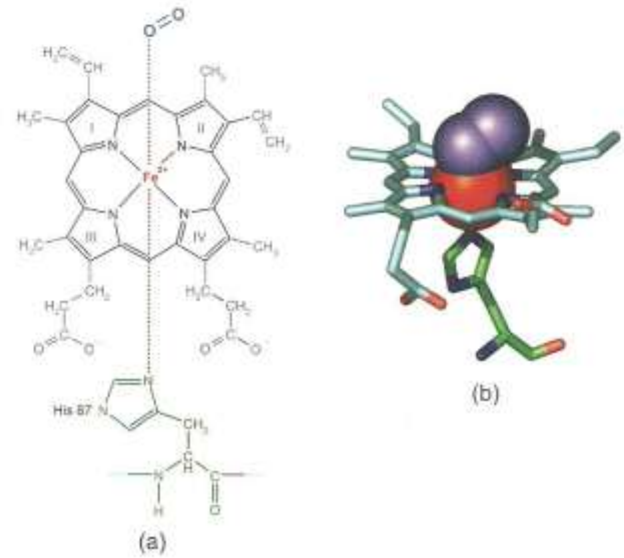


Fig. 3.2 Estrutura do grupo heme da hemoglobina oxigenada. a) O íon Fe^{2+} liga-se aos átomos de nitrogênio dos núcleos pirrólicos (numerados de I a IV) do anel porfirínico (em preto, com as cadeias laterais em cinza), à molécula de oxigênio e ao grupo imidazólico da histidina proximal (His 87). b) Representação tridimensional do heme.

grande número de ligações que mantêm essa associação. As grandes mudanças ocorrem nas áreas de contato entre os dímeros, que, efetivamente, se deslocam, um em relação ao outro. Como será descrito a seguir, essas mudanças são desencadeadas pela ligação do oxigênio ao grupo heme.

A oxigenação da hemoglobina determina alterações estruturais seqüenciais. Na desoxi-Hb, cada íon de ferro está situado fora do plano do grupo heme e o anel porfirínico é ligeiramente côncavo. Quando o oxigênio se liga ao heme de uma das subunidades, o ferro se desloca para o plano do heme, que se torna mais achatado, arrastando a His 87 à qual está ligado (Fig. 3.3) e, conseqüentemente, o próprio segmento da cadeia polipeptídica que contém este aminoácido. A movimentação deste segmento desloca outro segmento contíguo, segmentos estes que compõem as interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ entre os dímeros; dá-se o rompimento de várias ligações não-covalentes presentes apenas nas interfaces da desoxi-Hb, responsáveis pela sua estabilização. Há uma alteração da disposição relativa dos dímeros, que resulta em estreitamento do bolsão entre as subunidades β (Fig. 3.4). Deste modo, os deslocamentos em uma subunidade se propagam, produzindo uma alteração na conformação da subunidade em questão que é transmitida para as outras

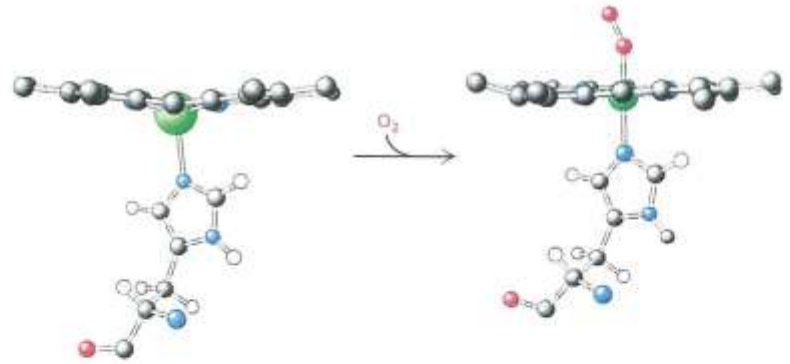
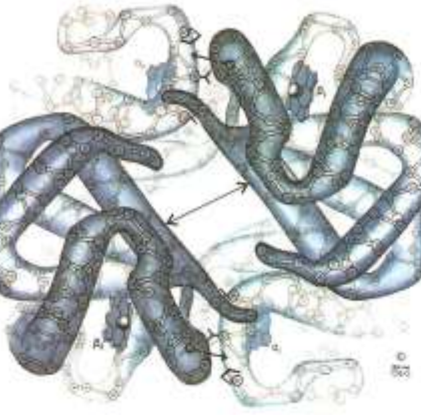
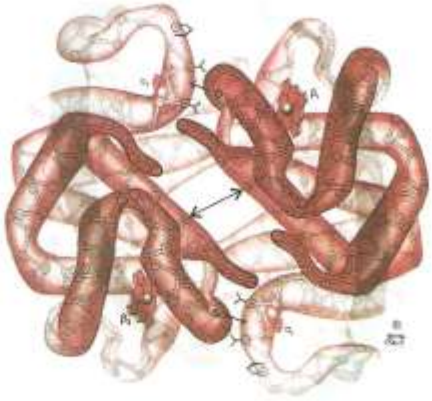


Fig. 3.3 A ligação do oxigênio ao Fe^{2+} do grupo heme provoca o deslocamento do ferro para o plano do anel porfirínico, que se torna mais achatado, deslocando a histidina proximal e iniciando uma série de alterações estruturais na hemoglobina. Reproduzida de Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. & Stryer, L.: Biochemistry, 5th edition. W. H. Freeman and Company, 2002.



(a)



(b)

Fig. 3.4 Estrutura tridimensional da desoxi-Hb (a) e oxi-Hb (b), com as cadeias β em primeiro plano. Na transformação desoxi-Hb → oxi-Hb, há a movimentação de um dímero em relação ao outro, simbolizada pelas setas largas sobre a molécula de desoxi-Hb e evidenciada pela mudança na posição relativa de alguns aminoácidos; ocorre, ainda, um estreitamento da cavidade central entre as cadeias β, indicado pelas setas duplas.

subunidades, por meio das áreas de contato entre elas. Em resumo, o pequeno deslocamento do ferro (cerca de 0,5 Å), causado pela ligação do oxigênio ao grupo heme de uma subunidade, dispara uma seqüência de eventos mecanicamente transmitidos, que alteram a estrutura quaternária da hemoglobina (Fig. 3.4).

A hemoglobina liga-se ao oxigênio cooperativamente

A ligação do oxigênio, como descrito, implica rearranjos moleculares sucessivos, já que uma subunidade não pode mudar sua conformação independentemente das outras. Estes movimentos coordenados determinam a dinâmica de oxigenação da hemoglobina: a ligação da primeira molécula de oxigênio facilita o preenchimento dos outros grupos heme. As novas conformações assumidas pela molécula de hemoglobina devido às sucessivas ligações com o oxigênio têm afinidades crescentes pelo oxigênio, de tal maneira que a ligação da quarta molécula de oxigênio é 300 vezes mais eficiente do que a ligação da primeira. A esse fenômeno dá-se o nome de *cooperatividade*. A cooperatividade resulta da influência exercida por um sítio sobre outros localizados em subunidades diferentes de uma mesma molécula, e, portanto, só pode ser apresentada por proteínas oligoméricas, como a hemoglobina e as enzimas alostéricas (Seção 19.2.1). No caso da mioglobina, por exemplo, que apresenta uma única cadeia polipeptídica e um único grupo heme, a cooperatividade, evidentemente, não é observada.

A diferença no mecanismo de oxigenação de mioglobina e hemoglobina está traduzida nas curvas de oxigenação destas proteínas: enquanto a mioglobina apresenta uma curva hiperbólica, a hemoglobina exibe uma curva sigmóide. Estas curvas mostram a porcentagem de oxigenação da proteína em função da pressão parcial de oxigênio (pO_2) (Fig. 3.5). A forma hiperbólica é aquela esperada para uma proteína com um único sítio de ligação e, portanto, a ligação de uma molécula de oxigênio a uma molécula de mioglobina não afeta a ligação de outras moléculas de oxigênio a outras moléculas de mioglobina. A curva sigmóide indica que a ligação das moléculas de oxigênio aos quatro heme não é independente, e que o preenchimento de um heme aumenta a afinidade dos outros heme, não ocupados, por oxigênio.

A cooperatividade exibida pela hemoglobina proporciona uma resposta mais sensível a variações na concentração de oxigênio, adequando-se, com perfeição, à sua função de transportar este gás. No sangue arterial que sai dos pulmões dos seres humanos, a pO_2 é alta (em média, 100 mmHg ou 100 torr[2]), e a hemoglobina fica 98% saturada com oxigênio; nos tecidos extrapulmonares, onde a pO_2 é baixa (sangue venoso), ela libera grande parte do oxigênio. Por exemplo, a pO_2 nos capilares que irrigam um músculo em atividade é cerca de 20 mmHg e a saturação da hemoglobina cai para

[2]Torr é igual a 1 mmHg; tem-se tornado a unidade de medida de pressão de escolha.

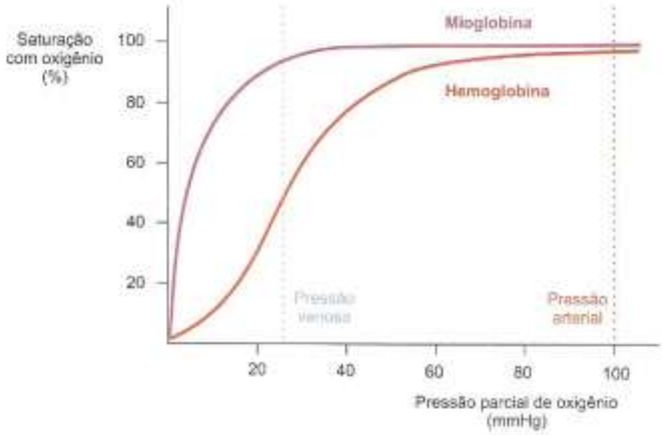


Fig. 3.5 Curva de saturação com oxigênio de mioglobina e hemoglobina; estão indicados os valores normais, ao nível do mar, da pO_2 venosa e da pO_2 arterial.

33%, ou seja, ela libera 65% do oxigênio associado. A mioglobina seria um transportador bem menos eficiente, já que menos de 10% do seu oxigênio seria liberado nessas condições. Todavia, sua alta afinidade por oxigênio, mesmo em baixa pO_2, permite que ela desempenhe eficientemente a função de reservatório de oxigênio nos músculos de mamíferos, onde é encontrada em abundância. A mioglobina tem afinidade por oxigênio maior que a hemoglobina em qualquer pO_2, o que permite que ele seja transferido do sangue para o músculo, onde fica associado à mioglobina e pode ser utilizado pelas mitocôndrias das células musculares.

3.3 FATORES QUE INTERFEREM NA LIGAÇÃO COM OXIGÊNIO

As hemácias contêm um composto que diminui a afinidade da hemoglobina por oxigênio

A hemoglobina de mamíferos, quando presente nas hemácias, tem afinidade menor por oxigênio do que quando purificada. Este é o resultado da presença, nestas células, de altos níveis de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) (Fig. 3.6), um composto sintetizado a partir de 1,3-bisfosfoglicerato, um intermediário da glicólise. A relação entre estes dados ficou esclarecida quando se adicionou BPG à hemoglobina purificada e observou-se uma redução da sua afinidade por oxigênio, traduzida por um deslocamento para a direita na sua curva de saturação com oxigênio (Fig. 3.7).

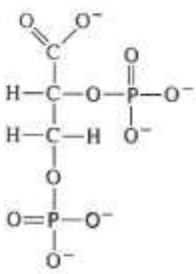


Fig. 3.6 Estrutura do 2,3-bisfosfoglicerato (BPG).

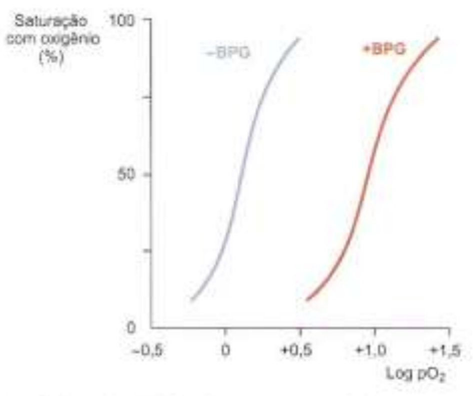


Fig. 3.7 Efeito do BPG sobre a saturação da hemoglobina com oxigênio. A saturação foi medida na ausência (curva azul) e na presença de BPG (curva vermelha).

O BPG liga-se preferencialmente à desoxi-Hb, que apresenta a cavidade entre as subunidades β suficientemente grande para alojá-lo. Esta cavidade é circundada por radicais carregados positivamente, que interagem com os grupos negativos do BPG (Fig. 3.8). Na oxi-Hb, a cavidade é menor (Fig. 3.4), o que dificulta a ligação do BPG. A conseqüência da ação do BPG é o predomínio da forma desoxigenada da hemoglobina, o que equivale a um decréscimo na sua afinidade por oxigênio. O efeito do BPG manifesta-se em baixas pressões de oxigênio, sendo suplantado por pressões elevadas de oxigênio, nas quais prevalece a oxi-Hb, como mostrado nas equações seguintes:

pO_2 baixa (tecidos)	pO_2 alta (pulmões)
$HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$	$O_2 + Hb \rightarrow HbO_2$
$Hb + BPG \rightarrow HbBPG$	$HbBPG \rightarrow Hb + BPG$
$HbO_2 + BPG \rightarrow HbBPG + O_2$	$O_2 + HbBPG \rightarrow BPG + HbO_2$

Assim, nas condições de alta pO_2 dos pulmões, a hemoglobina fica saturada com oxigênio, mesmo na presença de BPG. O seu papel fisiológico é aumentar substancialmente a liberação de oxigênio nos tecidos extrapulmonares, onde a pO_2 é baixa.

O nível de BPG nas hemácias aumenta, de modo gradativo, em condições associadas com hipóxia tissular (oxigenação deficitária dos tecidos) prolongada, como em anemias e altas altitudes. Este mecanismo adaptativo tenta compensar a menor disponibilidade de oxigênio para os pulmões existente nessas situações, com um aumento na liberação do gás para os tecidos.

A afinidade da hemoglobina por oxigênio também diminui com o aumento da temperatura, no intervalo de 37 a 41°C. Este efeito tem grande importância fisiológica porque permite maior disponibilidade de oxigênio quando a demanda

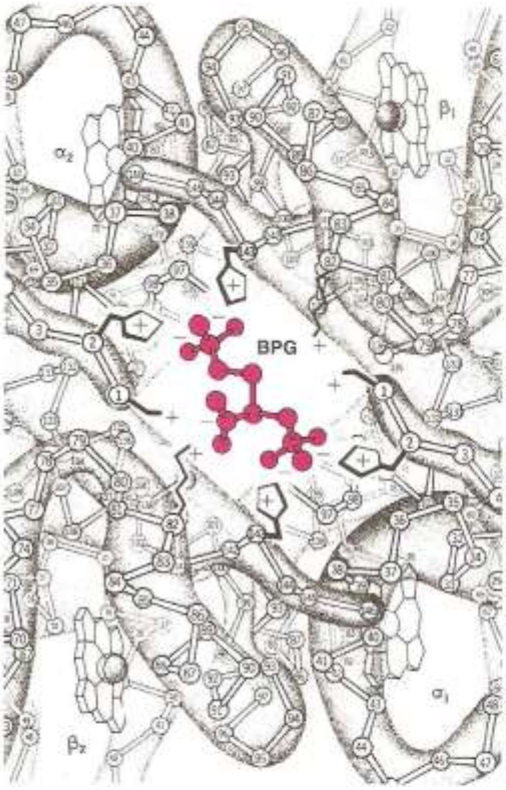


Fig. 3.8 Ligação do BPG à cavidade entre as cadeias β da desoxi-Hb. Os grupos com carga positiva que interagem com os grupos negativos do BPG são: aminoterminal (Val 1), imidazólico (His 2 e His 143) e amino (Lys 82), pertencentes a aminoácidos das duas cadeias β.

de energia é alta, devido ao aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, da temperatura, como acontece na febre e em grupos musculares sob contração intensa.

A ligação do oxigênio à hemoglobina depende do pH: efeito Bohr

Para cada valor de pO_2 considerado, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio varia com o pH, mesmo dentro dos estreitos limites fisiológicos de variação do pH: é tanto menor quanto menor o pH (Fig. 3.9). Os íons H^+ (como acontece com o BPG), ligam-se preferencialmente à desoxi-Hb, que passa, então, a constituir a forma predominante, o que corresponde a uma diminuição na afinidade da hemoglobina por oxigênio. A associação preferencial dos íons H^+ à desoxi-Hb evidencia que esta forma da proteína é uma base de Brönsted mais forte do que a forma oxigenada. Esta diferença de comportamento ácido-base é conseqüência da movimentação das subunidades da hemoglobina, devido à associação/dissociação de oxigênio, que modifica a relação espacial entre determinados aminoácidos e, conseqüentemente, os valores de pK_a de seus grupos ionizáveis.

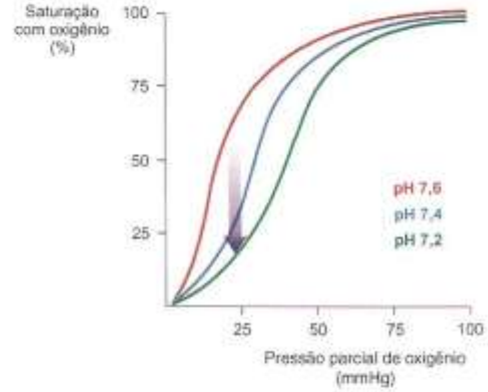


Fig. 3.9 Efeito do pH sobre a saturação da hemoglobina com oxigênio. A porcentagem de moléculas de hemoglobina oxigenada diminui com o aumento da concentração de H^+ (ver seta no gráfico).

Uma alteração importante refere-se à posição relativa de dois resíduos de aminoácidos das subunidades β, His146 e Asp94, localizados nas interfaces entre os dímeros: quando a hemoglobina é desoxigenada, estes resíduos ficam mais próximos do que eram na oxi-Hb. Esta aproximação promove a formação de uma ligação iônica entre o grupo carboxila (carga negativa) do Asp94 e o grupo imidazólico (carga positiva) da His146, que é uma das ligações existentes somente na desoxi-Hb. A interação iônica estabiliza a forma protonada da His146, tornando mais "difícil" a dissociação de seu próton: o valor do pK_a do grupo imidazólico passa de 6,5 a 8,0 aproximadamente, ou seja, converte-se em uma base de Brönsted mais forte, ficando protonada no pH do sangue venoso (7,2). Quando a hemoglobina é oxigenada, há um distanciamento entre His146 e Asp94 e a interação entre eles não mais se estabelece; o valor do pK_a da His146 cai para 6,5, ou seja, converte-se em um ácido de Brönsted mais forte e, no pH do sangue arterial (7,4), fica predominantemente desprotonado. Outros resíduos de aminoácidos comportam-se como a His146: sofrem alteração no valor de pK_a, devido a mudanças no seu microambiente, perdendo prótons quando a hemoglobina é oxigenada e ganhando prótons quando ela é desoxigenada. Em resumo, a conversão de oxi-Hb em desoxi-Hb é acompanhada por captação de prótons, e a sua oxigenação, por liberação de prótons. A influência do pH sobre a oxigenação da hemoglobina tem grande importância fisiológica, porque, nos organismos, um decréscimo no pH (produção de CO_2 pelo metabolismo) está sempre associado a uma maior demanda de oxigênio.

O conjunto dos fenômenos relacionados com o aumento do caráter básico da hemoglobina causado por sua desoxigenação e o aumento do caráter ácido quando ela se liga ao oxigênio constitui o *efeito Bohr*, que pode ser representado pelas equações:

pO_2 e pH mais baixos (tecidos)	pO_2 e pH mais altos (pulmões)
$HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$	$HHb + O_2 \rightarrow HHbO_2$
$Hb + H^+ \rightarrow HHb$	$HHbO_2 \rightarrow HbO_2 + H^+$
$HbO_2 + H^+ \rightarrow HHb + O_2$	$HHb + O_2 \rightarrow HbO_2 + H^+$

Para maior clareza, a representação do efeito Bohr não levou em conta a estequiometria do processo — na realidade, cada molécula de Hb pode combinar-se com 1 a 4 moléculas de O_2 e associar-se ou liberar de 1,2 a 2,8 H^+, dependendo de determinadas condições, como o pH, a concentração de 2,3-bisfosfoglicerato etc.

A análise destas equações revela o papel fundamental desempenhado pela hemoglobina na manutenção do pH plasmático: à medida que a pO_2 diminui e a concentração de H^+ aumenta, a hemoglobina libera O_2 e capta H^+. Quando a pO_2 aumenta e a concentração de H^+ diminui, ela se liga a O_2 e libera H^+. Estas são as condições encontradas nos tecidos e nos alvéolos pulmonares, respectivamente.

Nos tecidos, o CO_2 produzido pelo metabolismo celular difunde-se até as hemácias, onde é hidratado rapidamente em uma reação catalisada pela anidrase carbônica, formando H_2CO_3. No pH do sangue (7,4), o H_2CO_3 dissocia-se em HCO_3^- e H^+:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

A ocorrência destas duas reações consecutivas explica por que um aumento na concentração de CO_2 causa uma diminuição do pH. Este aumento de acidez, associado à baixa pO_2 tecidual, faz com que a hemoglobina libere O_2 e capte H^+, impedindo que ocorram grandes variações de pH. O HCO_3^-, produzido nas hemácias, difunde-se para o plasma e é transportado até os pulmões (Fig. 3.10). Cerca de 85% do CO_2 produzido nas células é transportado aos pulmões por este mecanismo; 10% ligado a grupos amino terminais da hemoglobina (carbamino-Hb) e de outras proteínas plasmáticas, e 5% em solução.

Nos pulmões a situação inverte-se. A alta pO_2 leva à oxigenação da hemoglobina e à dissociação de H^+. O HCO_3^- desloca-se do plasma para o interior das hemácias e combina-se com os H^+, formando H_2CO_3, que é convertido em CO_2 e H_2O pela anidrase carbônica. O CO_2 difunde-se das hemácias para o plasma, depois para os alvéolos pulmonares e é expirado. A liberação de prótons pela hemoglobina corrige o valor de pH que, de outro

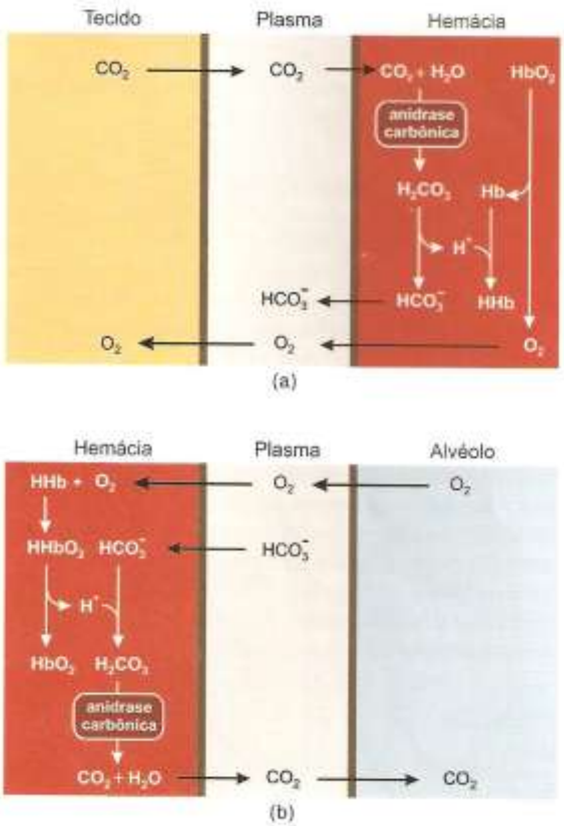


Fig. 3.10 Esquema dos processos que ocorrem nos tecidos (a) e nos pulmões (b) e possibilitam a manutenção do pH plasmático.

modo, tenderia a aumentar. De fato, com a baixa pCO_2 alveolar, o CO_2 é eliminado no ambiente, consumindo H^+ e HCO_3^-:

$$H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$$

Assim, a manutenção do pH fisiológico, imprescindível para o desempenho de qualquer das funções vitais, é obtida pela ação coordenada do sistema Hb/HbO_2 e do sistema CO_2/HCO_3^- (ver também Capítulo 1).

3.4 HEMOGLOBINA FETAL

O feto humano, e de outros mamíferos, tem uma hemoglobina diferente da HbA, a principal hemoglobina dos adultos. Na *hemoglobina fetal* (*HbF*), em lugar das subunidades β encontram-se outras cadeias polipeptídicas, chamadas γ (gama). A estrutura da HbF é, então, $\alpha_2\gamma_2$, em contraposição à estrutura $\alpha_2\beta_2$ da HbA.

A HbF tem maior afinidade por oxigênio que a HbA: sua curva de saturação com oxigênio é deslocada para a esquerda em relação à curva de saturação da HbA (Fig. 3.5). Graças a esta propriedade, o feto pode obter oxigênio do sangue da mãe, através da placenta. Efetivamente, HbF é oxigenada à custa da HbA materna.

A diferença de afinidade por oxigênio entre HbF e HbA é devida à força de ligação de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG, Seção 3.3) aos dois tipos de hemoglobina. As cadeias β e γ têm o mesmo número de resíduos de aminoácidos (146), dispostos em uma seqüência semelhante, exceto que, na posição 143, HbA tem uma histidina e HbF, uma serina; ou seja, um radical imidazólico com carga positiva foi substituído por um grupo polar sem carga. Conseqüentemente, na molécula de HbF existe um par a menos de grupos positivos na cavidade onde ocorre a ligação de BPG (Fig. 3.8), que, portanto, liga-se mais fracamente que na HbA. Como a concentração de BPG é igual nos sistemas circulatórios da mãe e do feto, e a HbF liga-se menos eficientemente ao BPG, a forma desoxigenada desta hemoglobina fica menos estável e a sua afinidade por oxigênio aumenta: o oxigênio flui da oxi-Hb da mãe para a desoxi-Hb do feto.

3.5 HEMOGLOBINAS ANORMAIS

Foram descritas centenas de anomalias hereditárias nos seres humanos causadas por mutações que determinam alterações na estrutura da hemoglobina ou que levam à diminuição da síntese de suas cadeias polipeptídicas. São as chamadas *hemoglobinopatias*, que podem ser clinicamente insignificantes ou constituírem doenças graves. As hemoglobinas mutantes introduziram o conceito de *patologia molecular*, que se refere a doenças causadas pela alteração de uma única proteína.

As mutações na molécula de hemoglobina ocasionam, freqüentemente, a substituição de um único aminoácido. O aminoácido modificado nas hemoglobinas mutantes pode ter localizações diversas, trazendo conseqüências variáveis. Quando está localizado na superfície da molécula, sua alteração geralmente é inócua. A grande exceção a esta regra é a *hemoglobina S* (*HbS*), que causa a *anemia falciforme* (Seção 2.8). A freqüência do gene de HbS, ao contrário dos genes de outras hemoglobinas mutadas, é alta, chegando a 40% em algumas regiões da África. Como a sobrevida dos homozigotos para HbS é baixa, somente uma forte pressão seletiva poderia explicar a alta incidência do gene defectivo, isto é, o heterozigoto deveria ter alguma vantagem em relação ao homozigoto normal. De fato, os portadores do gene mutado são resistentes a uma forma letal de *malária*. A incidência desta doença e a freqüência do gene para HbS são altamente correlacionadas. A anemia falciforme demonstra claramente que mutações deletérias podem constituir ferramentas da evolução, determinando uma maior probabilidade de sobrevivência de seus portadores.

Mutações que afetam aminoácidos situados no interior da molécula geralmente determinam a síntese de hemoglobinas não-funcionais. A perda da função normal deve-se a diferentes conseqüências dessas mutações: estrutura instável, afinidade por oxigênio alterada ou oxidação do ferro (Fe^{2+}) do grupo heme a Fe^{3+}.

Hemoglobinas instáveis, com estrutura espacial distorcida, podem resultar de ruptura de elementos da estrutura terciária, como acontece quando há substituição de um aminoácido por prolina, que interrompe a α-hélice. Em outros casos, a associação do grupo heme com a cadeia polipeptídica torna-se mais lábil, por causa da troca de um aminoácido com cadeia lateral apolar por outro com grupo R polar, o que altera o caráter hidrofóbico da cavidade onde se aloja o heme.

Alterações nas interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ entre os dímeros causam afinidade anormal por oxigênio. A afinidade é maior quando a mutação ocasiona rompimento de ligações que estabilizam a forma desoxigenada que, assim, mais facilmente se converte em oxiemoglobina; ao contrário, mutações que diminuem a estabilidade da forma oxigenada reduzem a afinidade por oxigênio.

A *meta-hemoglobina* (*HbM*) contém o ferro do grupo heme no estado férrico (Fe^{3+}), que não se liga ao oxigênio. Esta alteração pode resultar da exposição a reagentes oxidantes ou de mutações. A formação espontânea de meta-hemoglobina e de metamioglobina explica a cor marrom característica de sangue desidratado e de carnes deterioradas. Pacientes portadores de HbM são, geralmente, cianóticos: a pele e as mucosas exibem forte cor azulada, devido à concentração anormalmente elevada de desoxi-Hb na circulação arterial (a cor azulada das veias superficiais é uma conseqüência normal do seu alto conteúdo de desoxi-Hb). Esse tipo de anomalia só foi observada na forma heterozigota, certamente porque a homozigose seria fatal.

O segundo grupo de lesões genéticas é caracterizado pela síntese não-estequiométrica das subunidades da hemoglobina — são as *talassemias*, que têm alta incidência na região do Mar Mediterrâneo (*thalassa*, em grego, significa mar). Nas *α-talassemias*, geralmente causadas por deleção gênica, a produção das cadeias α é defectiva, enquanto nas *β-talassemias*, resultantes de vários tipos de mutações, faltam as cadeias β. Os homozigotos apresentam anemia severa e essa condição é denominada *talassemia maior*; os heterozigotos são assintomáticos (*talassemia menor*) e, como acontece na anemia falciforme, apresentam uma certa proteção contra a malária.

A hemoglobina pode sofrer, ainda, alterações químicas transitórias, resultantes de processos endógenos, como é o caso de sua glicosilação (Seção 2.6), ou da ação de drogas e poluentes ambientais.

BIBLIOGRAFIA

Allison AC: The discovery of resistance to malaria of sickle-cell heterozygotes. *Biochem Molec Biol Educ* **30**:279-287, 2002.

Dickerson RE, Geis I: Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity. *Trends Biochem Sci* **18**:385-390, 1982.

Giardina B et al: The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta Physiol Scand* **182** (3):229-244, 2004.

Perutz MF et al: The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**:1-34, 1998.

Scriver CR et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

4

O Sentido das Reações

Uma transformação, representada, por exemplo, por uma reação química, pode ser analisada sob dois aspectos fundamentais: a variação de energia envolvida (a *termodinâmica* da transformação) e a velocidade com que ocorre (a *cinética* da reação).

Em relação ao aspecto energético, só interessam os estados inicial e final da transformação, não importando o processo pelo qual ela se dá ou a velocidade com que ocorre. Nas transformações em que há liberação de energia, o sistema que sofreu a transformação tem, no estado final, um conteúdo energético menor do que o do estado inicial; estas transformações são ditas *espontâneas*. O grau de espontaneidade das transformações é avaliado pelo valor da diferença de energia entre os estados inicial e final. A expressão "espontânea", quando aplicada a reações químicas, precisa ser bem compreendida. O fato de uma reação ser espontânea ***não*** significa que ela ocorrerá imediatamente, tão logo se ponham em contato os reagentes; significa, tão-somente, que, ***se*** ocorrer, haverá liberação de energia. Em outras palavras, a espontaneidade da reação está completamente desvinculada de parâmetros cinéticos, como a velocidade. A transformação de diamante em grafite, por exemplo, é espontânea (porque, quando ocorre, libera energia) e, no entanto, os diamantes são bastante estáveis. Também é possível manter glicose em contato com oxigênio sem que ocorra oxidação do açúcar em tempo mensurável; a reação de oxidação de glicose por oxigênio é espontânea, por liberar energia quando ocorre, mas a sua velocidade é praticamente igual a zero. A quantidade de energia liberada por uma reação não guarda, portanto, relação alguma com o tempo consumido no processo.

Sobre os parâmetros termodinâmicos dos processos, não há interferência biológica possível: a espontaneidade de uma reação depende exclusivamente dos compostos que a constituem, de sua concentração e da temperatura. Assim, a quantidade de energia liberada na oxidação da glicose é a mesma, quer se processe *in vitro* ou por intermédio das complexas reações celulares, já que são considerados apenas os estados inicial e final. Sobre a velocidade com que o fenômeno ocorre, todavia, os organismos têm recursos para interferir, acelerando-o através de *catalisadores* (*enzimas*).

Neste capítulo, serão abordados alguns conceitos termodinâmicos, de forma operacional, de modo a permitir a compreensão de certas características das reações que se processam nos seres vivos. O próximo capítulo — Enzimas — tratará do aspecto cinético das reações biológicas.

4.1 VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE: CRITÉRIOS DE ESPONTANEIDADE

Uma reação apresenta diferentes valores de ΔG, com sinal positivo ou negativo

Qualquer reação química é acompanhada de uma variação de energia livre, referente à diferença entre o conteúdo energético dos produtos e reagentes. A *variação de energia livre* — a quantidade de energia capaz de realizar trabalho a temperatura e pressão constantes — é representada por ΔG. Quando medido[1] a 25°C e sob pressão de uma atmosfera,

[1] O valor de ΔG é expresso em quilojoules (kJ); um quilojoule equivale a 0,239 quilocaloria (kcal).

Tabela 4.1 Sinal de ΔG para algumas situações (I a V) de concentrações iniciais de A e B, na reação A ⇌ B, com $K_{eq} = 2$

Situação	Concentrações iniciais [A]	[B]	"Reação" ocorrida	Sinal do ΔG
I	8	4	4A → 4B	Negativo
II	6	6	2A → 2B	Negativo
III	4	8	—	Zero
IV	2	10	2B → 2A	Positivo
V	0	12	4B → 4A	Positivo

seu valor depende das espécies químicas que tomam parte na reação e de suas concentrações iniciais. Ainda mais, o sinal atribuído a ΔG reflete o sentido em que a reação ocorre. No caso de uma reação simples, do tipo

$$A \rightleftharpoons B$$

o valor de ΔG pode ser obtido calculando-se a quantidade de energia liberada desde o estado inicial até o final, que corresponde ao equilíbrio da reação. Se, para chegar ao equilíbrio, a reação aconteceu no sentido A → B (no sentido em que está escrita), o sinal de ΔG, por convenção, é negativo; se aconteceu no sentido B → A (no sentido oposto ao em que está escrita), o sinal de ΔG, por convenção, é positivo.

Para ilustrar como varia o ΔG em função das concentrações iniciais dos componentes de uma reação, suponha-se que a reação indicada tenha constante de equilíbrio igual a 2 ($K_{eq} = 2$); no equilíbrio, a relação [B]/[A] deve, portanto, ser igual a 2. Algumas situações iniciais hipotéticas, numeradas de I a V, encontram-se na Tabela 4.1. Em todas estas situações, o equilíbrio será atingido quando a concentração de B for igual a 8 (unidades de concentração, por exemplo, mol por litro) e a de A for igual a 4. Na situação I, onde a reação é iniciada com 8 de A e 4 de B, a reação deve processar-se no sentido A → B, até que seja atingida a concentração 8 de B, restando 4 de A. A partir deste ponto, não há mais transformação, a reação atingiu o equilíbrio: o valor de ΔG pode, então, ser aferido e lhe será atribuído sinal negativo, já que a reação ocorreu no sentido em que está escrita. Na situação II, quando a reação é iniciada com 6 de A e 6 de B, o equilíbrio final será o mesmo, mas a "quantidade" de transformação terá sido menor, apenas 2 de A terão sido convertidos em 2 de B; o valor de ΔG será menor e também negativo. A situação III — concentrações iniciais de A e B iguais a 4 e 8 respectivamente — é especial: neste caso, não há transformação, porque as concentrações iniciais já correspondem às do equilíbrio; o valor de ΔG será zero. Se, por outro lado, a concentração inicial de A for 2 e a concentração de B for 10 (situação IV), o equilíbrio será alcançado com 2 de B transformando-se em 2 de A, isto é, a transformação ocorrerá no sentido oposto às anteriores: o valor absoluto de ΔG será o mesmo da situação II, mas com sinal positivo. Um resultado análogo será verificado na comparação entre as situações V e I.

Resumindo, *para uma mesma reação* (A ⇌ B), *existirão vários valores de ΔG dependendo das concentrações iniciais de* A *e* B, *e a reação poderá ocorrer no sentido* A → B *ou* B → A, *também dependendo das concentrações iniciais de* A *e* B. *Por convenção, o valor de ΔG tem sinal negativo quando a transformação chegou ao equilíbrio com a reação processando-se no sentido em que foi escrita* (A → B) *e tem sinal positivo, quando o equilíbrio foi atingido com a reação processando-se no sentido contrário a este* (B → A).

Também para uma reação mais complexa, do tipo

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

as mesmas considerações são válidas, havendo vários valores de ΔG, dependendo das concentrações iniciais de A, B, C e D.

ΔG°′ indica o sentido da reação somente nas condições-padrão

A variação de energia livre (ΔG), por apresentar tantos valores diferentes, não é útil para comparar reações. Para tornar possível e cômoda esta comparação, define-se a *variação de energia livre padrão*, representada por ΔG°. A variação de energia livre padrão é um dos valores de variação de energia livre, obtida em condições padronizadas: concentrações iniciais de reagentes e produtos (A, B, C e D, no último exemplo) iguais a 1 M, temperatura de 25°C, pressão de 1 atmosfera e pH = 0. O valor de ΔG° é, portanto, a variação de energia livre entre o instante inicial,

dentro das condições-padrão, e o momento em que a reação entra em equilíbrio. Para os interesses da Bioquímica, introduz-se ainda uma pequena alteração: as medidas são efetuadas a pH = 7 em lugar de pH = 0; neste caso, para indicar esta diferença as notações são ΔG', para concentrações quaisquer das espécies envolvidas, e ΔG°', para concentrações 1 M.

Dependendo das concentrações iniciais dos reagentes e produtos, uma reação química pode atingir o equilíbrio, processando-se no sentido em que foi escrita ou no sentido contrário. Partindo-se das condições-padrão, o sinal convencionado para ΔG°' é negativo no primeiro caso e positivo no segundo, analogamente ao ΔG'.

Considerando-se uma reação hipotética $A + B \rightleftharpoons C + D$, em condições-padrão, quando, no equilíbrio, a concentração de C e a concentração de D são *maiores* que 1 M e, então, a reação ocorreu no sentido em que foi escrita, o ΔG°' é negativo. Este é o caso, por exemplo, da oxidação da glicose por oxigênio:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightleftharpoons 6\,CO_2 + 6\,H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -2.870 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Para uma outra reação $E + F \rightleftharpoons G + H$, também em condições padrão, pode ocorrer o inverso, isto é, as concentrações de G e H no equilíbrio são *menores* do que 1 M, o equilíbrio foi, portanto, obtido com a reação se processando no sentido contrário ao que foi escrito e o sinal de ΔG°' é positivo. É o caso da reação seguinte:

$$ADP + HPO_4^{2-} + H^+ \rightleftharpoons ATP + H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Naturalmente, esta reação pode ser escrita no sentido oposto. Como se trata da *mesma* reação, partindo da *mesma* concentração inicial de todos os componentes (1 M), o equilíbrio atingido será o mesmo, com aumento das concentrações de ADP e HPO_4^{2-} O valor de ΔG°' será o mesmo, entretanto, com sinal negativo, porque a reação processou-se no sentido em que foi escrita:

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + HPO_4^{2-} + H^+ \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

O sinal de ΔG°' indica, portanto, o sentido em que a reação ocorre em condições-padrão.

O valor de ΔG°' está relacionado com a constante de equilíbrio da reação

O valor de ΔG' de uma reação depende das concentrações iniciais de reagentes e produtos, e do valor de ΔG°', segundo a fórmula

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ\prime} + 2{,}3\ RT\ \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

onde R é a constante dos gases ($8{,}31\ \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura na escala Kelvin.

Quando uma reação atinge o equilíbrio, não há mais variação de energia e, portanto,

$$\Delta G' = 0$$

donde

$$\Delta G^{\circ\prime} = -2{,}3\ RT\ \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Na situação de equilíbrio, a fração da equação corresponde ao valor da constante de equilíbrio (K_{eq}):

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Portanto,

$$\Delta G^{\circ\prime} = -2{,}3\ RT \log K_{eq}$$

A variação de energia livre padrão está, pois, relacionada com a constante de equilíbrio da reação. Os valores de energia livre padrão e da constante de equilíbrio de diferentes reações (Tabela 4.2) permitem verificar que, quanto maior a constante de equilíbrio de uma reação, maior a quantidade de energia liberada em condições-padrão, para atingir o equilíbrio. E este equilíbrio pode ser atingido com a reação processando-se em dois sentidos diferentes:

a) No equilíbrio, a concentração de produtos é ***maior*** que a dos reagentes ($K_{eq} > 1$). Neste caso, o logaritmo de K_{eq} é positivo e o sinal de ΔG°' é negativo, ou seja, a reação processou-se no sentido em que foi escrita.

Tabela 4.2 Relação entre os valores da constante de equilíbrio e a variação de energia livre padrão a pH 7

K_{eq}	$\Delta G^{o\prime}$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,2
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0
10^{1}	−5,7
10^{2}	−11,4
10^{3}	−17,2
10^{4}	−22,8

b) No equilíbrio, a concentração de produtos é ***menor*** que a dos reagentes ($K_{eq} < 1$). Neste caso, o logaritmo de K_{eq} é negativo e o sinal de $\Delta G^{o\prime}$ é positivo, ou seja, a reação processou-se no sentido oposto ao escrito.

As reações podem ocorrer no sentido oposto ao das condições-padrão

Ficou estabelecido até aqui que, quando se trata de concentrações de reagentes e produtos fixadas em 1 M, o sentido da reação é indicado pelo sinal de $\Delta G^{o\prime}$. Pode-se demonstrar que, neste caso, o valor de $\Delta G^{o\prime}$ coincide com o valor de $\Delta G'$. Seja, por exemplo, a reação

$$A \rightleftharpoons B$$

com K_{eq} igual a 10^{-2} e, portanto, com $\Delta G^{o\prime}$ igual a $+11,4\ kJ \cdot mol^{-1}$ (Tabela 4.2). O valor de $\Delta G'$ é dado por

$$\Delta G' = \Delta G^{o\prime} + 2,3\ RT\ \log \frac{[B]}{[A]}$$

Na condição examinada, as concentrações de A e B são iguais a 1 M, e portanto $[B]/[A] = 1$ e $2,3\ RT \log [B]/[A] = 0$. Teremos, então,

$$\Delta G' = \Delta G^{o\prime}$$

e a reação ocorre no sentido indicado por $\Delta G^{o\prime}$ e $\Delta G'$, ou seja, de B para A ($B \rightarrow A$).

Considere-se agora, para a mesma reação, a situação em que a concentração inicial de reagente é significativamente maior do que a de produto, por exemplo $[A] = 1$ M e $[B] = 10^{-3}$M. A relação $[B]/[A]$ será 10^{-3} e o sinal de $\Delta G'$ será negativo:

$$\Delta G' = \Delta G^{o\prime} + 2,3\ RT\ \log 10^{-3}$$
$$\Delta G' = \Delta G^{o\prime} + 2,3\ (8,31 \times 10^{-3} \times 298) \times (-3)$$
$$\Delta G' = \Delta G^{o\prime} - 17,08$$
$$\Delta G' = 11,4 - 17,08$$
$$\Delta G' = -5,68\ kJ \cdot mol^{-1}$$

Neste caso, a reação ocorrerá no sentido indicado por $\Delta G'$, ou seja, de A para B ($A \rightarrow B$), contrário ao sentido em que ocorre nas condições-padrão.

Generalizando, *o sentido das reações é estabelecido pelo sinal de $\Delta G'$; no caso das condições-padrão, seu valor coincide com o de $\Delta G^{o\prime}$. Quando as concentrações iniciais dos reagentes e produtos são diferentes de 1 M, a reação poderá ocorrer em um sentido ou no oposto, dependendo dos valores dessas concentrações e, portanto, de $\Delta G'$.* As reações com $\Delta G^{o\prime}$ positivo poderão ocorrer no sentido em que estão escritas, desde que a relação das concentrações iniciais de produtos e reagentes seja menor do que a constante de equilíbrio, ou seja, em condições onde o $\Delta G'$ é negativo.

Um composto é considerado rico em energia segundo o valor do $\Delta G^{\circ\prime}$ da hidrólise de uma de suas ligações

A grande utilidade do conceito e dos valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ para a Bioquímica é estabelecer um parâmetro que permite comparar diferentes reações. Como o $\Delta G'$ de cada reação varia com as concentrações iniciais de reagentes e produtos, tais comparações somente podem ser feitas por meio dos valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ das diferentes reações.

Adicionalmente, os valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ são muito úteis para avaliar o conteúdo energético de diferentes compostos. Para tanto, analisa-se a reação de hidrólise de uma ligação específica do composto; em muitos casos, tal ligação é estabelecida com um grupo fosfato (Tabela 4.3). Considere-se o caso do *ATP* (*adenosina trifosfato*), um composto essencial do metabolismo. O ATP e seus derivados — *ADP* (*adenosina difosfato*) e *AMP* (*adenosina monofosfato*) — são constituídos por uma base nitrogenada (adenina), um açúcar (ribose) e, pelo menos, um grupo fosfato[2] (Fig. 4.1). O grupo fosfato mais interno à molécula está ligado à ribose por ligação éster fosfórico e a ligação entre os outros dois grupos fosfato é do tipo anidrido fosfórico. A reação de hidrólise do ATP produz ADP e fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4), representado por P_i, e apresenta $\Delta G^{\circ\prime}$ igual a $-31\ kJ \cdot mol^{-1}$:

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + HPO_4^{2-} + H^+$$

Como o $\Delta G^{\circ\prime}$ da reação de hidrólise é negativo e tem valor absoluto maior do que $25\ kJ \cdot mol^{-1}$, o ATP é classificado como um *composto rico em energia*. Outros exemplos de $\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólise de compostos fosforilados estão listados na Tabela 4.4.

O consumo da energia do ATP para a realização das atividades celulares envolve a transferência do grupo fosfato terminal para moléculas aceptoras e, em apenas alguns casos, a sua hidrólise em ADP e P_i (ver a seguir).

Algumas reações não podem ser revertidas nas condições celulares

Como foi discutido, é possível, teoricamente, que uma reação ocorra no sentido inverso ao das condições-padrão. Biologicamente, no entanto, nem sempre isto é viável. Um exemplo é a reação de hidrólise de ATP em ADP e P_i, que tem $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo e com valor absoluto alto. A constante de equilíbrio da reação é, pois, muito grande e, conseqüentemente, para que a reação pudesse ocorrer no sentido da síntese de ATP, seria necessário que as concentrações iniciais de ADP e P_i fossem exageradamente altas. Tais valores de concentração nunca são encontrados nas células e, portanto,

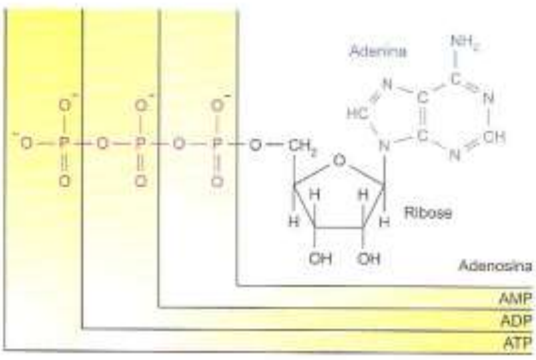
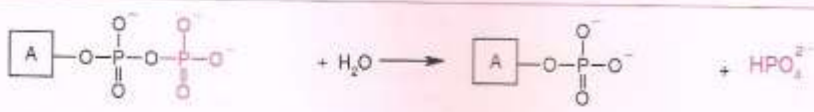


Fig. 4.1 Estrutura da adenosina, adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP). Nos três nucleotídios (AMP, ADP e ATP), o grupo fosfato está unido à ribose da adenosina por ligação éster fosfórico ($\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólise = $-15\ kJ \cdot mol^{-1}$); no ADP e no ATP, a ligação com o(s) outro(s) grupo(s) fosfato é do tipo anidrido fosfórico ($\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólise = $-31\ kJ \cdot mol^{-1}$).

[2]Compostos com esta estrutura são designados *nucleotídios*, por serem os monômeros constituintes dos ácidos nucleicos, embora desempenhem outras funções, como é o caso do ATP. A porção da molécula do nucleotídio formada pela base nitrogenada ligada ao açúcar é chamada *nucleosídio* (*adenosina*, quando a base é a *adenina*).

Tabela 4.3 Classificação de ligações segundo os produtos de sua hidrólise e valores aproximados de $\Delta G^{\circ\prime}$ das reações. Reações de hidrólise de ATP, ADP e AMP

Tipo de ligação	Reação de hidrólise	$\Delta G^{\circ\prime}$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)
Fosfoenol		−60
Anidrido carboxílico-fosfórico		−35
Éster fosfórico		−15
Tioéster		−30
Anidrido fosfórico		−31
Anidrido fosfórico		−31
Éster fosfórico		−15

A classificação de uma dada ligação é obtida por análise dos tipos de compostos produzidos pela hidrólise daquela ligação. Por exemplo, se os compostos resultantes da hidrólise forem um ácido carboxílico e ácido fosfórico (HPO_4^{2-} a pH 7,4), a ligação é classificada como *anidrido carboxílico-fosfórico* (anidrido misto ou acil-fosfato); se os compostos resultantes forem um álcool e ácido fosfórico, a ligação é classificada como *éster fosfórico*; quando se formarem dois ácidos fosfóricos, a ligação é *anidrido fosfórico*. Notar que a classificação refere-se à ligação, e não ao composto como um todo. A = adenosina.

a reação, simplesmente como foi escrita, jamais é utilizada para a síntese de ATP *in vivo*. O mecanismo biológico para produzir ATP é extremamente complexo e será analisado no Capítulo 11.

Na verdade, reações de hidrólise de compostos ricos em energia, como o ATP, raramente ocorrem "sozinhas" nas células, apesar de terem $\Delta G^{\circ\prime}$ tão favoráveis. Vale lembrar, neste ponto, que o fato de o valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ ser negativo e alto significa tão-somente que, *se* a reação ocorrer, haverá grande liberação de energia. A reação de hidrólise ocorre lentamente na ausência de um catalisador. Dito de outra forma, a reação de hidrólise de ATP é muito favorável termodinamicamente, mas desfavorável cineticamente. Além disso, as enzimas capazes de promover a hidrólise de ATP

Tabela 4.4 Exemplos de compostos fosforilados: tipo de ligação hidrolisada e variação de energia livre padrão a pH 7 da reação de hidrólise

Composto	Tipo de ligação hidrolisada	$\Delta G^{\circ\prime}$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)
Fosfoenolpiruvato	Fosfoenol	−62
1,3-Bisfosfoglicerato	Anidrido carboxílico-fosfórico	−49
Fosfocreatina	Fosfoguanidino	−43
ATP (a ADP + P_i)	Anidrido fosfórico	−31
Acetil-CoA	Tioéster	−31
Glicose 1-fosfato	Éster fosfórico	−21
Frutose 6-fosfato	Éster fosfórico	−14

Todos os compostos são classificados como *compostos ricos em energia*, menos glicose 1-fosfato e frutose 6-fosfato. A estrutura da fosfocreatina encontra-se na Seção 22.3, as do ATP e ADP na Fig. 4.1 e as demais no Capítulo 9. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4).

são poucas e estão submetidas a rigoroso controle celular, atuando sempre associadas a transformações que consomem energia. Embora o ATP sofra hidrólise somente nesses casos, ele apresenta alta capacidade de transferência do grupo fosfato para moléculas aceptoras, esta sim, uma reação freqüente no metabolismo, e espontânea. Graças a esta propriedade, o ATP cumpre um papel fundamental, o de possibilitar a substituição de processos termodinamicamente inviáveis por outros viáveis, dos quais ele participa. *Esta discussão será retomada no Capítulo 8, onde serão apresentados exemplos ilustrativos da atuação do ATP.*

Na célula, reações com $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo são acopladas a reações com $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo

Reações com $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo podem proceder no sentido em que estão escritas (no sentido oposto ao indicado pelo $\Delta G^{\circ\prime}$), quando se encontram fora das condições-padrão, ou seja, quando as concentrações de reagentes e produtos são diferentes de 1 M. Ao longo das seqüências de reações que compõem o metabolismo celular, isto ocorre porque as reações com $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo estão acopladas a reações subseqüentes que têm $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo. O acoplamento consiste no fato de pelo menos um dos produtos da primeira reação ser usado como reagente da segunda reação. Por exemplo:

$$
\begin{array}{lll}
A \rightleftharpoons B + C & & \Delta G^{\circ\prime} = +13\ kJ \cdot mol^{-1} \\
C + D \rightleftharpoons E & & \Delta G^{\circ\prime} = -22\ kJ \cdot mol^{-1} \\
\hline
A + D \rightleftharpoons B + E & & \Delta G^{\circ\prime} = -9\ kJ \cdot mol^{-1}
\end{array}
$$

O consumo contínuo de C pela segunda reação estabelece, para a primeira reação, uma razão [B] [C]/[A] sempre menor do que a do equilíbrio — o sinal de $\Delta G'$ da primeira reação torna-se negativo e a reação processa-se no sentido $A \rightarrow B + C$, apesar do valor positivo de seu $\Delta G^{\circ\prime}$. O processo global

$$A + D \rightleftharpoons B + E$$

apresenta, então, $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo.

4.2 REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO

A variação de energia livre de reações de óxido-redução é aferida pela variação do potencial de redução

Muitas das reações do metabolismo processam-se com redução e oxidação dos compostos participantes. A oxidação de um composto consiste na perda de elétrons de sua forma reduzida, que se converte na forma oxidada:

$$A_{red} \rightleftharpoons A_{ox} + e^-$$

As formas oxidada e reduzida do composto (A_{ox}/A_{red}) constituem um sistema chamado *par redox*. A redução é a conversão da forma oxidada na forma reduzida de um composto, por ganho de elétrons:

$$B_{ox} + e^- \rightleftharpoons B_{red}$$

Redução e oxidação são processos acoplados, ou seja, um composto oxida-se reduzindo um outro, e, por isso, este tipo de reação é chamado de *reação de óxido-redução*.

$$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$$

Em muitas reações biológicas de óxido-redução, os elétrons transferidos são acompanhados de prótons, ou seja, há transferência de átomos de hidrogênio:

$$\underset{(red)}{AH_2} + \underset{(ox)}{B} \rightleftharpoons \underset{(ox)}{A} + \underset{(red)}{BH_2}$$

A tendência de um par redox (A_{ox}/A_{red}) em perder ou ganhar elétrons é expressa pelo seu *potencial de redução* (ou *potencial de óxido-redução*), representado por *E*. Analogamente ao valor de ΔG, este potencial depende não só das espécies envolvidas, mas, para cada espécie, das concentrações da forma oxidada e da forma reduzida. Define-se também o *potencial de redução padrão, E°*, para concentração 1 M da forma oxidada e 1 M da forma reduzida. Assim, haverá valores diferentes para o E de um par redox, mas um só valor para o seu E°.

As medidas de E° são obtidas por comparação com um par redox assumido como padrão ($2\ H^+/H_2$), componente do eletrodo-padrão. O *eletrodo-padrão* consiste em uma solução 1 M de H^+ em equilíbrio com gás hidrogênio ($2\ H^+ + 2\ e^- \rightleftharpoons H_2$) com uma atmosfera de pressão e tem, por convenção, E° igual a zero volt. Para medir o E° de um par redox (A_{ox}/A_{red}), utiliza-se uma solução de concentração 1 M da forma oxidada (A_{ox}) e 1 M da forma reduzida (A_{red}), e pH = 0. Quando este sistema é conectado ao eletrodo-padrão, é gerada entre eles uma força eletromotriz, medida em volts, cujo valor absoluto é o E° do composto. A este valor é atribuído, *por convenção*, o sinal + ou o sinal −, se o par redox receber elétrons do eletrodo-padrão ou doar elétrons para o eletrodo-padrão. Como no caso do ΔG, as medidas de E° e de E em pH = 7 recebem a notação $E^{\circ\prime}$ e E'.

Quando as concentrações das formas oxidada e reduzida forem diferentes de 1 M, o potencial de redução do sistema (E′) será função dessas concentrações e do potencial de redução padrão (E°′):

$$E' = E^{\circ\prime} + \frac{2{,}3RT}{n\mathcal{F}} \log \frac{[\text{forma oxidada}]}{[\text{forma reduzida}]}$$

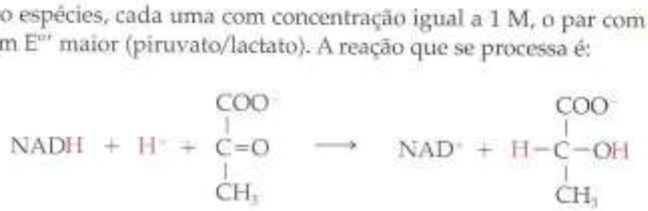
onde aparecem as concentrações das formas oxidada e reduzida. Esta é a *equação de Nernst*.

O valor de E°′ é uma medida da afinidade de um par redox por elétrons, ou seja, quanto maior o potencial, maior esta afinidade. Portanto, quando dois pares com E°′ diferentes são acoplados, o par de E°′ menor reduzirá o par de E°′ maior. Considerem-se dois pares redox:

$$\underset{(ox)}{NAD^+} + 2\,e^- + 2H^+ \rightleftharpoons \underset{(red)}{NADH} + H^+ \qquad E^{\circ\prime} = -0{,}32\ V$$

$$\underset{\substack{\text{Piruvato}\\(ox)}}{CH_3{-}CO{-}COO^-} + 2\,e^- + 2H^+ \rightleftharpoons \underset{\substack{\text{Lactato}\\(red)}}{CH_3{-}CH(OH){-}COO^-} \qquad E^{\circ\prime} = -0{,}19\ V$$

Misturando-se as quatro espécies, cada uma com concentração igual a 1 M, o par com $E^{o\prime}$ menor (NAD^+/NADH) doa elétrons para o par com $E^{o\prime}$ maior (piruvato/lactato). A reação que se processa é:



na qual o par NAD^+/NADH é o redutor e o par piruvato/lactato é o oxidante. A variação de potencial de redução padrão ($\Delta E^{o\prime}$) ocorrida é:

$$\begin{aligned}\Delta E^{o\prime} &= E^{o\prime} \text{ do oxidante} - E^{o\prime} \text{ do redutor}\\ \Delta E^{o\prime} &= -0{,}19 - (-0{,}32)\\ \Delta E^{o\prime} &= +0{,}13 \text{ V}\end{aligned}$$

De fato, essa transformação é espontânea. Nas reações de óxido-redução, a variação de energia livre padrão pode ser determinada através da variação do potencial de redução padrão ($\Delta E^{o\prime}$):

$$\Delta G^{o\prime} = -n\mathcal{F}\Delta E^{o\prime}$$

onde n é o número de elétrons transferidos e $\mathcal{F}$ é a constante de Faraday (96,5 kJ · V^{-1} · mol^{-1}).

A transferência de elétrons é sempre acompanhada de queda de energia livre ($\Delta E^{o\prime}$ positivo e $\Delta G^{o\prime}$ negativo). A variação de energia livre padrão da reação considerada é:

$$\begin{aligned}\Delta G^{o\prime} &= -n\mathcal{F}\Delta E^{o\prime}\\ \Delta G^{o\prime} &= -2 \times 96{,}5 \times 0{,}13\\ \Delta G^{o\prime} &= -25{,}09 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\end{aligned}$$

Na verdade, foi o valor positivo de $\Delta E^{o\prime}$ o determinante do valor negativo de $\Delta G^{o\prime}$ e, portanto, da viabilidade da transformação.

Na reação tomada como exemplo, à medida que a transferência de elétrons se processa, diminui a concentração de NADH (o elemento do par redox NAD^+/NADH efetivamente capaz de doar elétrons) e aumenta a concentração de NAD^+, pois cada molécula de NADH que doa elétrons transforma-se em NAD^+. Portanto, a relação NAD^+/NADH deixa de ser 1 M/1 M, assumindo valores gradativamente maiores, e o valor de E′ vai aumentando. Por outro lado, os elétrons cedidos pelo par NAD^+/NADH são recebidos pelo piruvato, o elemento do par piruvato/lactato capaz de receber elétrons. À medida que a passagem de elétrons é feita, diminui a concentração de piruvato e aumenta a concentração de lactato e, portanto, a relação de concentração piruvato/lactato também deixa de ser 1 M/1 M, gradativamente assume valores menores e o E′ vai diminuindo.

Em conseqüência destas variações, os potenciais de redução (E′) dos dois pares vão ficando cada vez mais próximos: o valor de $\Delta E'$ torna-se cada vez menor, diminuindo, paralelamente, o valor de $\Delta G'$. Quando o E′ dos dois pares se igualarem, $\Delta E'$ torna-se igual a zero, $\Delta G'$ também se reduz a zero, não há mais deslocamento de elétrons e a reação "pára", isto é, a reação atingiu o equilíbrio.

BIBLIOGRAFIA

Alberty RA: *Thermodynamics of Biochemical Reactions*. Wiley-Interscience, 2003.

Atkins PW, Palma J: *Physical Chemistry*, 7th ed. W.H. Freeman, 2001.

Lambert FL: Entropy is simple, qualitatively. *J Chem Educ* **79** (10):1241-1246, 2002.

Tinoco I et al: *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Science*, 4th ed. Prentice Hall, 2002.

5

Enzimas

A manutenção da vida celular depende da contínua ocorrência de um conjunto de reações químicas, que devem atender duas exigências fundamentais: (1) devem ocorrer em *velocidades adequadas* à fisiologia celular — a insuficiência na produção ou na remoção de metabólitos pode levar a condições patológicas, e (2) precisam ser altamente *específicas*, de modo a gerar produtos definidos.

Quando se examina a composição química de uma célula simples como a de *Escherichia coli* (Tabela 5.1), uma bactéria presente no trato intestinal humano, pode parecer improvável obter a exatidão das reações necessárias para manutenção e reprodução dessa bactéria frente à grande variedade de compostos ali presentes. Em células de eucariotos, o número de compostos químicos é ainda maior, e, mesmo considerando a compartimentalização em diferentes estruturas celulares, cada organela contém uma formidável diversidade de compostos, potencialmente capazes de reagir uns com os outros. Por outro lado, nas temperaturas relativamente baixas em que vivem as células, as velocidades destas reações são desprezíveis, e as moléculas presentes, praticamente inertes. De fato, uma reação química pode ser termodinamicamente viável ou espontânea (isto é, com conteúdo energético dos produtos menor do que o dos reagentes – Capítulo 4), mas ter velocidade igual a zero ou muito próxima de zero. Por exemplo, cristais ou soluções de glicose podem ser mantidos em contato com oxigênio, sem que ocorra oxidação do açúcar, apesar de a oxidação de glicose ser uma reação que libera grande quantidade de energia. A velocidade com que esta transformação ocorre, em tempo mensurável, é igual a zero.

A presença de *enzimas* dirigindo todas as reações celulares permite atender às duas exigências inicialmente apresentadas.

Tabela 5.1 Composição química aproximada de uma célula de *E. coli*

Substâncias	% do peso celular	Número de tipos diferentes
Água	70	1
Íons inorgânicos (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-})	1	20
Proteínas	15	2.500
Aminoácidos e seus precursores	0,5	100
Carboidratos e seus precursores	3	200
Lipídios e seus precursores	2	50
DNA	1	1
RNA	6	1.000
Nucleotídios e seus precursores	0,5	200
Outras moléculas	0,2	200

Tabela 5.2 Aumento da velocidade da reação por catálise enzimática

Reação	Enzima	Vc/V[1]
$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$	Anidrase carbônica	10^7
Diidroxiacetona fosfato $\rightleftharpoons$ Gliceraldeído 3-fosfato	Triose fosfato isomerase	10^9
Glicose + ATP $\rightleftharpoons$ Glicose 6-fosfato + ADP + H^+	Hexoquinase	10^{10}
Glicose 6-fosfato $\rightleftharpoons$ Glicose 1-fosfato	Fosfoglicomutase	10^{12}
Uréia + $H_2O \rightleftharpoons 2\,NH_3 + CO_2$	Urease	10^{14}
Orotidina monofosfato $\rightleftharpoons$ Uridina monofosfato + CO_2	Orotidina monofosfato descarboxilase	10^{17}

[1]Vc = Velocidade da reação catalisada; V = Velocidade da reação não catalisada.

Como *catalisadores*, as enzimas aumentam de várias ordens de grandeza a velocidade das reações que catalisam (Tabela 5.2) — a oxidação de glicose por oxigênio por meio de uma seqüência de reações catalisadas por enzimas pode ser feita nas células em minutos. Para se ter uma idéia do papel indispensável das enzimas, basta lembrar que mesmo reações que têm água como reagente (e a concentração da água é 55,5 M) são catalisadas por enzimas. Ademais, por serem altamente específicas, "selecionam", entre todas as reações potencialmente possíveis, aquelas que efetivamente irão ocorrer.

Até recentemente, admitia-se que todos os catalisadores biológicos fossem proteicos. Há pouco mais de duas décadas, entretanto, foram caracterizadas reações celulares que têm como catalisadores moléculas específicas de RNA. A descoberta foi surpreendente e este tipo particular de catalisador recebeu o nome de *ribozima*. Comporta-se de forma semelhante às proteínas enzimáticas, obedecendo também à cinética de Michaelis-Menten (Seção 5.6). Seu emprego nas reações metabólicas, entretanto, está restrito a alguns casos especiais, conquanto importantes, e as considerações que serão feitas daqui para diante referem-se exclusivamente às enzimas "proteicas".

5.1 ATUAÇÃO DAS ENZIMAS NA CINÉTICA DAS REAÇÕES

As enzimas aceleram a velocidade da reação por diminuir sua energia de ativação

Tomando o exemplo simples da conversão irreversível de uma substância A em B ($A \rightarrow B$), a *velocidade da reação* (*v*) será:

$$v = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{ou} \quad v = -\frac{d[A]}{dt}$$

[B] e [A] representam as concentrações molares de B e de A, e a unidade da velocidade (v) é moles por litro por segundo.

A última equação mostra que a velocidade da reação diminui à medida que a reação prossegue e a concentração de A diminui. A velocidade é, portanto, proporcional à concentração de A:

$$v = k[A]$$

A constante *k* é chamada *constante de velocidade* da reação, com unidade de seg^{-1}. Esta é uma reação de *primeira ordem*, já que sua velocidade depende da concentração do reagente com expoente igual a 1.

A maior parte das reações químicas processadas nos organismos são mais complexas, por envolverem, pelo menos, três moléculas diferentes e por serem, geralmente, reversíveis. São reações de *segunda ordem*, representadas, por exemplo, por

$$2A \rightleftharpoons B + C \quad \text{ou} \quad A + B \rightleftharpoons C + D$$

para as quais, pode-se demonstrar, as velocidades de reação serão, respectivamente,

$$v = k[A]^2 \quad \text{e} \quad v = k[A][B]$$

Para um melhor entendimento dos fatores que interferem na velocidade de reação, é importante analisar como ocorre a transição entre reagente e produto (ou entre reagentes e produtos). Considere-se o diagrama de uma reação espontânea (Fig. 5.1) que mostra a variação de energia livre do sistema em função de um parâmetro genérico da reação que mede a sua progressão, o seu caminho. Neste tipo de reação, é claro, a energia livre dos produtos é menor do que a dos reagentes. Nota-se, ainda, que o reagente, para se transformar no produto, deve passar por um estado intermediário, de maior energia livre. Assim, para reagir, as moléculas devem ter uma quantidade de energia que lhes permita atingir o estado reativo, chamado *estado de transição*. Trata-se de uma etapa que o reagente deve atravessar para transformar-se no produto.

Uma reação de primeira ordem envolve, muitas vezes, alterações da molécula do reagente (único), que requerem energia e que a fazem alcançar o estado de transição. Esta condição, para cada molécula, ocorre ocasionalmente, de modo que somente uma fração das moléculas está apta a sofrer a reação. Uma reação de segunda ordem só ocorre quando duas moléculas diferentes colidem — ao se chocarem, as moléculas devem estar com orientação apropriada umas em relação às outras e a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir o estado de transição. Muitos choques são improdutivos ou porque ocorrem entre moléculas direcionadas de modo inadequado, ou porque as colisões não são suficientemente energéticas. Analogamente à reação de primeira ordem, somente parte das moléculas está em condições de reagir.

Para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como *energia livre de ativação* (ou *energia de ativação*). Esta energia é, portanto, a barreira que separa os reagentes dos produtos (Fig. 5.1) e equivale à energia adicional à energia média das moléculas de reagente, necessária para atingir o estado de transição. A velocidade de uma reação será diretamente proporcional ao número de moléculas com energia igual ou maior do que a energia do estado de transição.

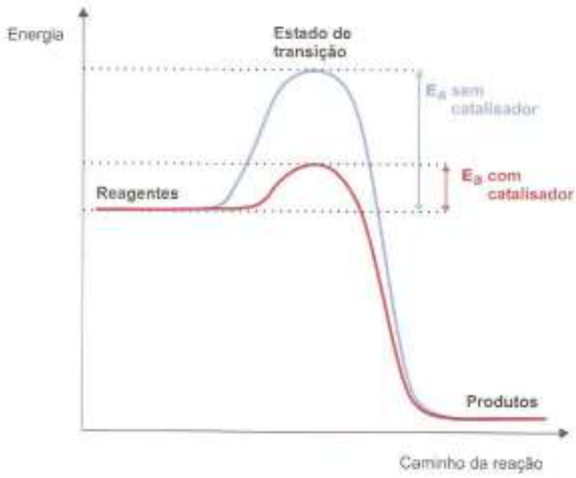


Fig. 5.1 Diagrama mostrando a variação de energia livre em função do caminho de uma reação espontânea hipotética. Na presença do catalisador, a reação ocorre por um caminho alternativo com energia de ativação (E_a) menor.

Em uma população de moléculas, nem todas têm o mesmo conteúdo energético. Algumas têm conteúdo muito pequeno, outras, muito grande, e a maioria apresenta um conteúdo médio, característico da temperatura na qual a população se encontra. Quando se eleva a temperatura de um sistema, as moléculas, no seu conjunto, adquirem um conteúdo energético maior, mas é respeitado o mesmo padrão de distribuição de energia entre elas (Fig. 5.2).

A decorrência das considerações expostas é que a velocidade de reação pode ser aumentada de três maneiras diferentes:

1. *aumentando a concentração do reagente*, como estabelecido pela equação da velocidade;
2. *elevando a temperatura* — um número maior de moléculas atinge a energia de ativação (Fig. 5.3 b);

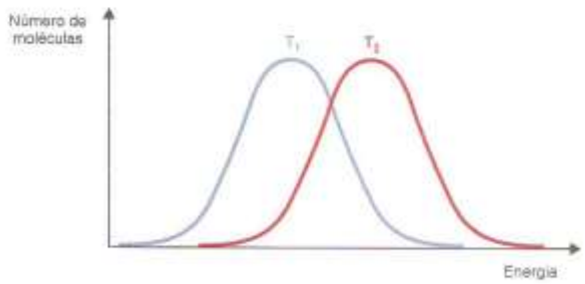


Fig. 5.2 Representação do conteúdo energético das moléculas de uma população em duas temperaturas, sendo $T_2 > T_1$.

3. *diminuindo a energia de ativação* — mesmo mantida a temperatura, aumenta a população de moléculas com energia necessária para reagir (Fig. 5.3 c).

A redução no valor da energia de ativação pode ser obtida pela presença de catalisadores, e é o processo empregado pelos seres vivos para acelerar suas reações químicas.

Os *catalisadores* são substâncias que aceleram a velocidade de uma reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo. Como sua concentração permanece constante, podem atuar em quantidades mínimas, ditas *catalíticas*, várias ordens de grandeza menores do que as concentrações dos reagentes. O catalisador participa efetivamente da reação, sofrendo alterações de sua estrutura química durante o processo; invariavelmente, porém, retorna à sua forma original quando a reação termina.

Todas as células dispõem de proteínas com função catalítica: são as *enzimas*, que, na verdade, catalisam praticamente todas as reações químicas que se processam nos seres vivos. Nas reações enzimáticas, os reagentes são chamados *substratos*.

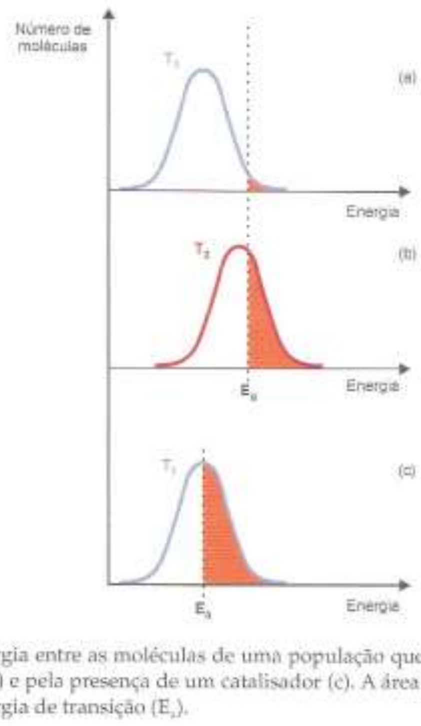


Fig. 5.3 Alteração da distribuição de energia entre as moléculas de uma população que se encontram em uma temperatura T_1 (a) por aumento da temperatura ($T_2 > T_1$) (b) e pela presença de um catalisador (c). A área colorida representa a fração da população com energia igual ou maior do que a energia de transição (E_a).

A eficiência da catálise enzimática deriva da ligação do substrato à enzima

Embora o total da molécula enzimática seja necessário para o papel catalítico, a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima, chamada *sítio ativo* (ou *centro ativo*) da enzima. O sítio ativo constitui uma cavidade com forma definida, revestida por cadeias laterais de aminoácidos, algumas das quais ajudam a ligar o substrato e outras que participam diretamente da catálise. Esses aminoácidos são trazidos à proximidade uns dos outros pelos dobramentos da cadeia polipeptídica que definem a estrutura espacial da proteína. A forma do sítio ativo e os grupos R dos aminoácidos que dele fazem parte são responsáveis pela grande especificidade das enzimas, pois permitem à enzima "reconhecer" seu substrato. De fato, uma molécula, para ser aceita como substrato, deve ter uma forma espacial complementar à do sítio ativo e conter grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo.

A relação substrato-enzima não deve ser entendida como um modelo rígido de chave-fechadura. Este modelo exemplifica a especificidade de uma enzima pelo seu substrato, mas não explica toda a complexidade da relação estabelecida entre eles durante a catálise. Na verdade, a análise da estrutura de uma enzima na ausência e na presença do substrato — feita por difração de raios X e outros métodos — revela com clareza que a ligação do substrato induz uma mudança na conformação da enzima (Fig. 5.4). Com efeito, a união do substrato à enzima altera o delicado balanço de interações responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima, amoldando sua forma à forma do substrato e fazendo-a adquirir uma nova configuração, ideal para a catálise.

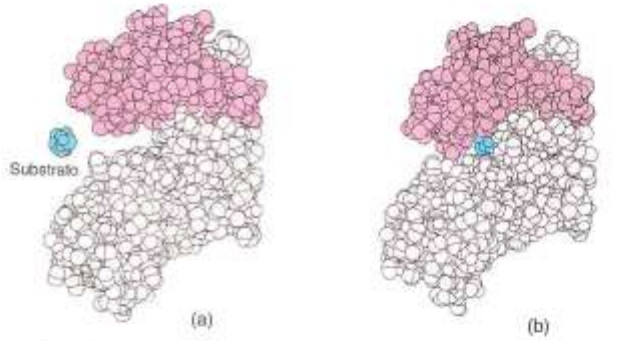


Fig. 5.4 Mudança da conformação da enzima induzida pela ligação com o substrato. O exemplo mostra a hexoquinase antes (a) e depois (b) de se ligar ao substrato, a glicose. A molécula da enzima consta de dois domínios, que se aproximam, encaixando o substrato.

A ligação à enzima modifica também a molécula do substrato, que é submetida a tensão e distorção, assumindo uma conformação aproximada à que tem no estado de transição, mas com menor conteúdo energético. Ainda mais, a ligação das moléculas dos substratos ao sítio ativo propicia sua correta orientação e sua aproximação, favorecendo a reação, que passa a depender muito menos dos choques casuais entre moléculas. Estes são alguns dos mecanismos que explicam a catálise enzimática. Na verdade, as enzimas reproduzem os mecanismos da catálise não-enzimática de reações orgânicas, tais como: catálise ácido-básica, catálise covalente e catálise por íons metálicos. Nestes processos, cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo contêm grupos ácidos ou básicos (Fig. 2.1) que adicionam ou removem prótons do substrato, ou formam ligações covalentes transitórias com o substrato. Também é freqüente, no sítio ativo de enzimas, a ocorrência de íons metálicos que apresentam diferentes atuações catalíticas.

De qualquer uma das formas mencionadas, os catalisadores, as enzimas inclusive, criam um novo "caminho" para a reação com um novo estado de transição, que requer uma energia de ativação menor (Fig. 5.1).

Um exemplo simples desse novo caminho é a hidrólise de um éster catalisada por ácido (Fig. 5.5). A reação de hidrólise consiste no ataque do oxigênio (que tem carga residual negativa), pertencente à molécula de água, ao carbono presente no éster (que tem carga residual positiva, em virtude de sua dupla ligação com o oxigênio). A energia de ativação requerida para atingir o estado de transição é alta. Os íons H^+ originados da dissociação do ácido criam um caminho alternativo para a reação: o íon H^+ liga-se ao oxigênio presente no éster, aumentando a carga positiva do

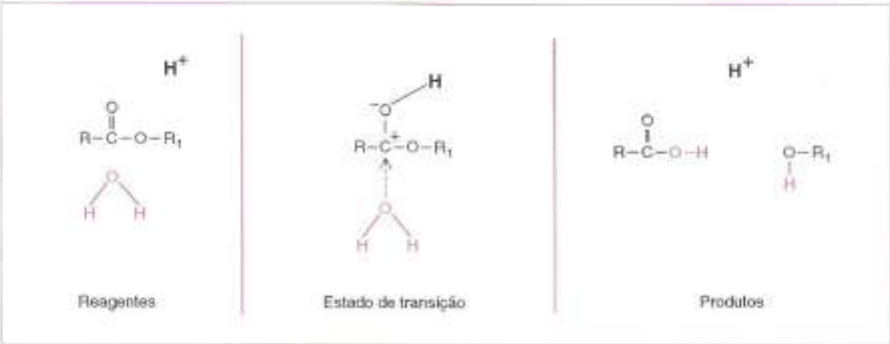


Fig. 5.5 Mecanismo da hidrólise de um éster catalisada por um ácido. A presença dos íons H^+ altera a distribuição de cargas elétricas do éster, criando um caminho de reação que necessita de energia de ativação menor do que o da reação não catalisada.

carbono e tornando-o mais susceptível ao ataque do oxigênio da água. Para este novo caminho a energia necessária é menor e, portanto, em uma mesma temperatura, mais moléculas poderão reagir e a velocidade da reação será aumentada pela presença de H^+. Seguindo modelo semelhante, muitas reações podem ser aceleradas por íons OH^-, por íons de metais etc.

Se a mesma reação fosse catalisada por uma enzima, a atuação catalítica do grupo positivo H^+ (Fig. 5.5) poderia ser exercida por um grupo NH_3^+ pertencente à cadeia lateral de um resíduo de lisina do sítio ativo. E, em razão do conjunto de mecanismos citados, a catálise enzimática seria muito mais eficiente.

As enzimas apresentam outras grandes vantagens em relação aos catalisadores não-enzimáticos

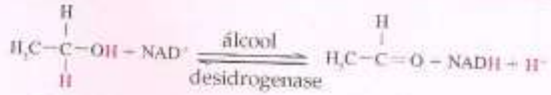
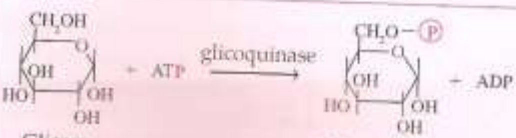
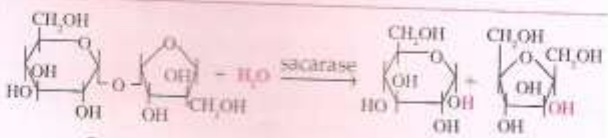
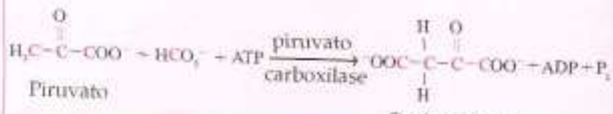
As enzimas, como todas as proteínas, são sintetizadas pelas próprias células. Sua presença nas células torna possível a ocorrência, a velocidades apreciáveis, de reações cujas velocidades seriam desprezíveis na sua ausência (Tabela 5.2). Ainda mais: como as enzimas apresentam alto grau de *especificidade*, ocorrerão em uma célula, dentre todas as reações potencialmente possíveis entre as numerosas substâncias presentes, apenas aquelas reações para as quais a célula possua enzimas específicas. Além de catalisarem reações específicas com velocidades várias ordens de grandeza maiores do que os catalisadores não-enzimáticos, as enzimas apresentam sobres eles outras vantagens: *sua concentração celular e sua atividade podem ser reguladas*, permitindo o ajuste a diferentes condições fisiológicas.

Resumindo, as enzimas (1) diminuem a energia de ativação, levando a altas velocidades de reação, (2) são muito específicas, (3) são sintetizadas pelas próprias células e (4) têm concentração e atividade moduláveis, permitindo um ajuste fino do metabolismo ao ambiente celular. O conjunto destes aspectos favoráveis possibilita a manutenção da vida, justificando o alto investimento energético necessário para a síntese de enzimas.

5.2 CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS ENZIMAS

Pelas regras oficiais de classificação e nomenclatura, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (Tabela 5.3). Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambigüidade. Assim, por exemplo, a enzima que catalisa a remoção de elétrons do etanol (portanto, uma *óxido-redutase*) é designada *álcool:NAD⁺:óxido-redutase* e recebe o número de classificação EC 1.1.1.1 (*EC* de *Enzyme Commission*). Esta nomenclatura oficial é, na prática, muitas vezes desobedecida em favor de nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. A enzima citada que catalisa a oxidação do etanol é comumente referida como *álcool desidrogenase*; a enzima que catalisa a síntese de glicogênio (oficialmente designada *UDPglicose:glicogênio 4-α-D-glicosiltransferase*) é chamada *glicogênio sintase*. Como se vê nestes exemplos, na nomenclatura usual, o nome é dado indicando o substrato, seguido de uma outra palavra terminada em *ase* que especifica o tipo de reação que a enzima catalisa. Mesmo esta forma simplificada de nomenclatura apresenta exceções, como é o caso das enzimas digestivas: *pepsina*, *tripsina* etc., cujos nomes triviais tornaram-se clássicos. Apesar disso, não é necessário

Tabela 5.3 As seis classes de enzimas e as reações que catalisam

Classe	Tipo de reação	Exemplo
1. Óxido-redutases	Óxido-redução $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$	 Etanol — Acetaldeído
2. Transferases	Transferência de grupos $A-X + B \rightleftharpoons A + B-X$	 Glicose — Glicose 6-fosfato
3. Hidrolases	Hidrólise $A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$	 Sacarose — Glicose — Frutose
4. Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação $A{=}B + X-Y \rightleftharpoons A(X)-B(Y)$	 Fumarato — Malato
5. Isomerases	Rearranjos intramoleculares $A(X)-B(Y) \rightleftharpoons A(Y)-B(X)$	 Glicose 6-fosfato — Frutose 6-fosfato
6. Ligases	Condensação de duas moléculas, associada ao consumo de ATP $A + B \rightleftharpoons A-B$	 Piruvato — Oxaloacetato

Ⓟ $= PO_3^{2-}$

memorizar os nomes das enzimas, pois, com um pouco de prática, é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa, ou vice-versa.

5.3 GRAUS DE ESPECIFICIDADE DAS ENZIMAS

Geralmente há uma grande diferença de tamanho entre as moléculas de enzimas e as de seus substratos. As enzimas são macromoléculas proteicas — mesmo as mais simples são formadas de mais de uma centena de aminoácidos — e suas massas molares variam de 10.000 a alguns milhões, enquanto a massa molar dos substratos é muitas ordens de grandeza inferior (Tabela 5.4). Esta desproporção de tamanho viabiliza o encaixe do substrato no sítio ativo e as alterações de sua molécula que ocorrem na catálise enzimática.

Tabela 5.4 Massas molares aproximadas de enzimas e de seus substratos

Enzima	Substrato	Massa molar aproximada
Catalase		200.000
	H_2O_2	34
Urease		500.000
	Uréia	60
Fosfofrutoquinase		380.000
	Frutose 6-fosfato	300
Glutamina sintetase		600.000
	Glutamato	150

Como cada enzima possui uma organização estrutural específica, o seu sítio ativo permite a ligação apenas do seu substrato, trazendo grande especificidade para a catálise. O nível de especificidade varia com a enzima considerada. Há enzimas, por exemplo, que aceitam como substratos vários aminoácidos, enquanto outras exigem um aminoácido determinado. Entretanto, qualquer que seja o grau de especificidade apresentado pelas enzimas, é sempre maior do que o apresentado pelos catalisadores não-enzimáticos. Os íons H^+, por exemplo, agem como catalisadores em um grande número de reações, incluindo a hidrólise de proteínas, polissacarídios e ésteres. As *enzimas proteolíticas*, ao contrário, são específicas para a hidrólise de proteínas, não atuando sobre carboidratos ou lipídios, para cujas hidrólises são requeridas enzimas próprias. Entre as enzimas proteolíticas aparecem diferentes graus de especificidade: a *pepsina* hidrolisa ligações peptídicas das quais participem grupos carboxílicos de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e a *tripsina* reconhece apenas ligações peptídicas formadas por arginina ou lisina. Graus extremos de especificidade são encontrados entre as *L-aminoxidases*, por exemplo. São enzimas capazes de reconhecer aminoácidos na configuração L, sendo inativas para isômeros na forma D.

5.4 FATORES QUE INTERFEREM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA: pH E TEMPERATURA

A estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças na conformação da proteína. Isto torna a atividade enzimática dependente das características do meio, notadamente do pH e da temperatura.

Para a maioria das enzimas existe um valor de pH no qual a sua atividade é máxima — a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo. Ele é característico para cada enzima (Tabela 5.5), mas, com freqüência, está próximo do pH neutro. A influência do pH sobre a catálise enzimática pode ser melhor compreendida lembrando que as enzimas apresentam grupos tituláveis nos resíduos de arginina, aspartato, cisteína, glutamato, histidina, lisina e tirosina. Alguns destes grupos podem fazer parte do sítio ativo ou serem importantes na manutenção da

Tabela 5.5 pH ótimo de enzimas

Enzimas	pH ótimo
Pepsina	1,5
Fosfatase ácida	4,5
Urease	6,5
Tripsina	7,8
Arginase	9,7

estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns destes grupos apresentam-se protonados ou desprotonados e, portanto, habilitados ou não a estabelecer ligações iônicas que influenciam a conformação da enzima. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Este *pH ótimo* decorre, então, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da seqüência em que estão organizados, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar suas cargas. A eficiência da catálise dependerá, então, de encontrarem-se, enzima e substrato, com conformação e carga adequadas para permitir a interação.

A velocidade da reação enzimática, a 0°C, apresenta valores próximos de zero. Como ocorre com a maioria das reações químicas, a velocidade é favorecida pela elevação da *temperatura*, que aumenta a energia cinética das moléculas, fazendo com que um número cada vez maior delas atinja o estado de transição. O gradativo aumento da velocidade só se verifica enquanto a enzima conservar sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das proteínas globulares — enzimas inclusive — são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações na conformação da molécula, acarretando a perda do poder de catálise. Entre 0°C e 50°C vive a grande maioria dos seres vivos; há, entretanto, exceções, entre as quais a mais notável é representada por bactérias que vivem em águas termais, com temperaturas ao redor de 100°C. A estabilidade térmica das proteínas desses microrganismos constitui um caso excepcional (Seção 2.8).

As considerações anteriores, referentes a amplas variações de pH e temperatura, são pertinentes ao estudo da atividade enzimática *in vitro*. Os seres vivos, entretanto, têm suas reações ocorrendo em ambiente tamponado, já que todas as células dispõem de mecanismos para manutenção do pH. Mesmo assim, microambientes celulares podem apresentar pequenas variações de pH que afetam a atividade das enzimas e que servem, eventualmente, para o controle de sua ação. A temperatura, contudo, tem influência decisiva sobre a distribuição geográfica dos seres vivos. Microrganismos, vegetais e animais ectotérmicos têm suas atividades vitais inteiramente dependentes da temperatura ambiente; aves e mamíferos, endotérmicos, são menos afetados.

5.5 CINÉTICA DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

Enzima e substrato formam um complexo transitório

O estudo das reações enzimáticas e de uma série de propriedades das enzimas baseia-se em medidas da *velocidade* da reação. Esta velocidade é diretamente proporcional à concentração do reagente: para a reação $A \rightarrow B$, a equação da velocidade é $v = k[A]$. À medida que a reação se processa, isto é, A é transformado em B, a concentração do reagente diminui gradativamente e, portanto, a velocidade da reação também, mantendo-se sempre proporcional às concentrações decrescentes de A. Ou seja, a velocidade da reação varia com o tempo. Se a velocidade da reação for determinada após um intervalo de tempo Δt, o que se irá obter é a velocidade *média* da reação durante o intervalo Δt, ao longo do qual a concentração de A variou. Para que se possa medir a velocidade de reação efetivamente proporcional à concentração inicial de A, é necessário adotar como medida de velocidade a *velocidade inicial* (v_0). Esta velocidade é conseguida utilizando-se um intervalo de tempo muito pequeno, durante o qual a conversão de A em B tenha sido tão reduzida que a concentração de A possa ser considerada constante — é o chamado *tempo inicial*. Naturalmente, o tempo inicial difere para cada reação considerada, podendo variar de frações de segundo até várias horas. Operacionalmente, convenciona-se para a medida de velocidade inicial o tempo em que menos de 10% do reagente (substrato) tenham sido transformados em produto.

Grande parte das reações catalisadas enzimaticamente obedecem ao padrão

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

Para o tratamento da cinética enzimática, entretanto, será adotado um modelo mais simples, em que há apenas um substrato e um produto, representado por

$$S \rightleftharpoons P$$

É o caso, por exemplo, de algumas reações de isomerização, em que um isômero é transformado em outro.

Como para todos os casos a serem analisados, a velocidade de reação é medida em tempos iniciais, quando a concentração de P é desprezível, é possível fazer a aproximação

$$S \longrightarrow P$$

A reação catalisada enzimaticamente processa-se em duas etapas: na primeira, a enzima (E) liga-se reversivelmente ao substrato (S), formando um *complexo enzima-substrato* (ES):

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \tag{1}$$

Na segunda fase, é liberado o produto (P) e a enzima:

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P \tag{2}$$

Havendo dois ou mais substratos, eles devem ligar-se simultaneamente ao sítio ativo, onde ocorre a reação, com liberação dos produtos (Fig. 5.6).

Uma vez na forma livre, a enzima pode, então, ligar-se a outra molécula de substrato (seta tracejada no esquema seguinte). A representação conjunta das etapas (1) e (2) é:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

As equações de velocidade para as reações componentes do processo são:

$$\begin{aligned} v_1 &= k_1\,[E][S] \\ v_{-1} &= k_{-1}\,[ES] \\ v_2 &= k_2\,[ES] \end{aligned}$$

Para o tratamento matemático dos dados experimentais obtidos com reações enzimáticas, Michaelis e Menten admitiram que $k_{-1} >> k_2$. São duas as decorrências desta diferença de grandeza entre as constantes de velocidade k_{-1} e k_2:

1. a primeira reação chega a estabelecer um equilíbrio, que não seria possível se k_2 fosse maior do que k_{-1} — o complexo ES, formado entre a enzima e o substrato, é decomposto em enzima livre (E) e substrato (S) com velocidade maior do que origina enzima livre (E) e produto (P);
2. a velocidade da reação global, ou seja, a velocidade da formação do produto, é igual a v_2, já que esta é a etapa mais lenta e limitante do processo.

Estes pressupostos revelaram-se verdadeiros para um grande número de enzimas, chamadas *enzimas michaelianas*, e serão admitidos para as considerações feitas a seguir. Para muitas enzimas, entretanto, as premissas consideradas por aqueles autores não são verdadeiras e a cinética de suas reações é diferente da que será tratada aqui.

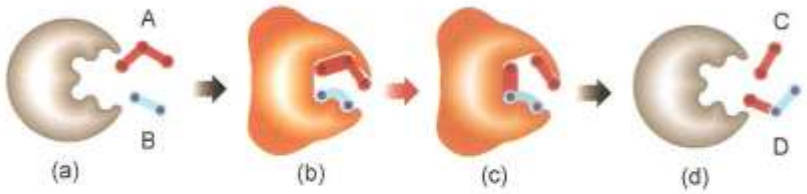


Fig. 5.6 Esquema de uma reação enzimática que consiste na transferência de um grupo químico do composto A para o composto B. Em (a) está representada a enzima com o seu sítio ativo, que é específico para estes compostos. Ambos os substratos alojam-se no sítio ativo, resultando alterações na estrutura da enzima e dos substratos (b); a reação ocorre (c); os produtos C e D são liberados e a enzima retorna à sua configuração original (d).

Nas reações enzimáticas, a concentração de enzima é, via de regra, muito menor que a de substrato. Realmente, em virtude da diferença de massa molar entre eles (Tabela 5.3), soluções eqüimolares de enzima e substrato não são usadas na prática e, muitas vezes, nem sequer poderiam ser obtidas. Um exemplo ilustrativo é a reação de síntese de glutamina a partir de glutamato (Seção 17.2.1), catalisada pela glutamina sintetase:

$$\text{Glutamato} + NH_4^+ + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glutamina} + \text{ADP} + HPO_4^{2-} + H^+$$

Uma solução 10 mM de glutamato (mol = 150) contém 1,5 g/L; para conter o mesmo número de moléculas, uma solução de glutamina sintetase (mol = 600.000) deveria ser também 10 mM, ou seja, conter 6 kg de enzima por litro! Na prática, portanto, as soluções de enzimas são muito mais diluídas do que as de seus substratos, e, nas reações enzimáticas, o número de moléculas de enzima é muito inferior ao número de moléculas do substrato. Esta situação é semelhante à celular, onde a concentração de substrato chega a ser 10^6 vezes superior à da enzima.

Apesar dessa disparidade numérica, quando se adiciona enzima a uma solução de substrato, nem todas as moléculas de enzima combinam-se com o substrato (Fig. 5.7, situação I). Como k_2 tem valor muito menor do que k_{-1}, estabelece-se um equilíbrio entre E, S e ES, já que a conversão ES → E + P é comparativamente muito lenta. Este equilíbrio entre E, S e ES é atingido em frações de segundo depois de serem postos em contato enzima e substrato e tem concentrações definidas e constantes de cada espécie, havendo sempre uma porcentagem de enzima livre (E). Na Fig. 5.8, esta fase ocorre até o tempo t_1. Sob este aspecto, a reação $E + S \rightleftharpoons ES$ em nada difere de uma reação química genérica $A + B \rightleftharpoons C$, em cujo equilíbrio existem, concomitantemente, as espécies A, B e C. As concentrações de cada espécie dependerão do valor da constante de equilíbrio da reação e, portanto, dos valores das constantes de velocidade k_1 e k_{-1}:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad K_{eq} = \frac{[ES]}{[E][S]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

Tendo havido formação de ES, inicia-se a segunda parte da reação enzimática,

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

aquela que efetivamente gera o produto, com *velocidade diretamente proporcional à concentração de ES*.

Note-se que o fato de ES estar sendo consumido na formação do produto não provoca diminuição significativa da sua concentração, pois há sempre excesso de substrato (em relação à quantidade de enzima) para combinar-se com a enzima que é liberada quando se forma o produto.

Esta situação mantém-se durante algum tempo, o *tempo inicial*, durante o qual é medida a *velocidade inicial*: contínua formação do produto e concentrações estáveis de ES e E; a pequena e contínua diminuição da concentração de S não é significativa, face ao seu grande excesso. Na Fig. 5.8, este período corresponde ao intervalo $t_1 - t_2$. Naturalmente, em tempos maiores do que os tempos iniciais (tempos maiores do que t_2, na Fig. 5.8), a diminuição da concentração de substrato passa a ser significativa: a reação prosseguirá com velocidades cada vez menores (ao longo do intervalo de tempo Δt, na Fig. 5.8), até que todo o substrato seja transformado em produto (tempo t_3, na Fig. 5.8). *As considerações que serão feitas daqui para diante restringem-se exclusivamente aos tempos iniciais e são, portanto, referentes a medidas de velocidades iniciais* (v_0).

A influência da concentração do substrato na velocidade da reação pode ser esclarecida pela análise de três situações de concentrações diferentes de substrato (situações I, II e III da Fig. 5.7), com uma *mesma* concentração de enzima. É importante ressaltar que, nestas situações, todas as medidas de velocidade, inclusive a $V_{máx}$, são realizadas após um *mesmo* tempo inicial. Ou seja, a influência do tempo na velocidade da reação não está sendo analisada na Fig. 5.7.

A primeira situação (situação I da Fig. 5.7) supõe uma pequena concentração de substrato (pequena, porém muito maior do que a concentração de enzima) e que o equilíbrio estabelecido seja tal que apenas 25% das moléculas de enzimas presentes estejam ligadas ao substrato, formando o complexo ES. Os 75% restantes estarão livres, na forma E. No segundo caso (situação II, Fig. 5.7), admite-se igual quantidade de enzima, mas concentração de substrato maior do que a anterior. Novamente se estabelecerá o equilíbrio imediato da primeira etapa da reação. A constante de equilíbrio será, naturalmente, a mesma. Como, neste caso, a concentração de S é maior do que no caso anterior, o equilíbrio será obtido com uma concentração de ES maior e uma concentração de E menor. O aumento da concen-

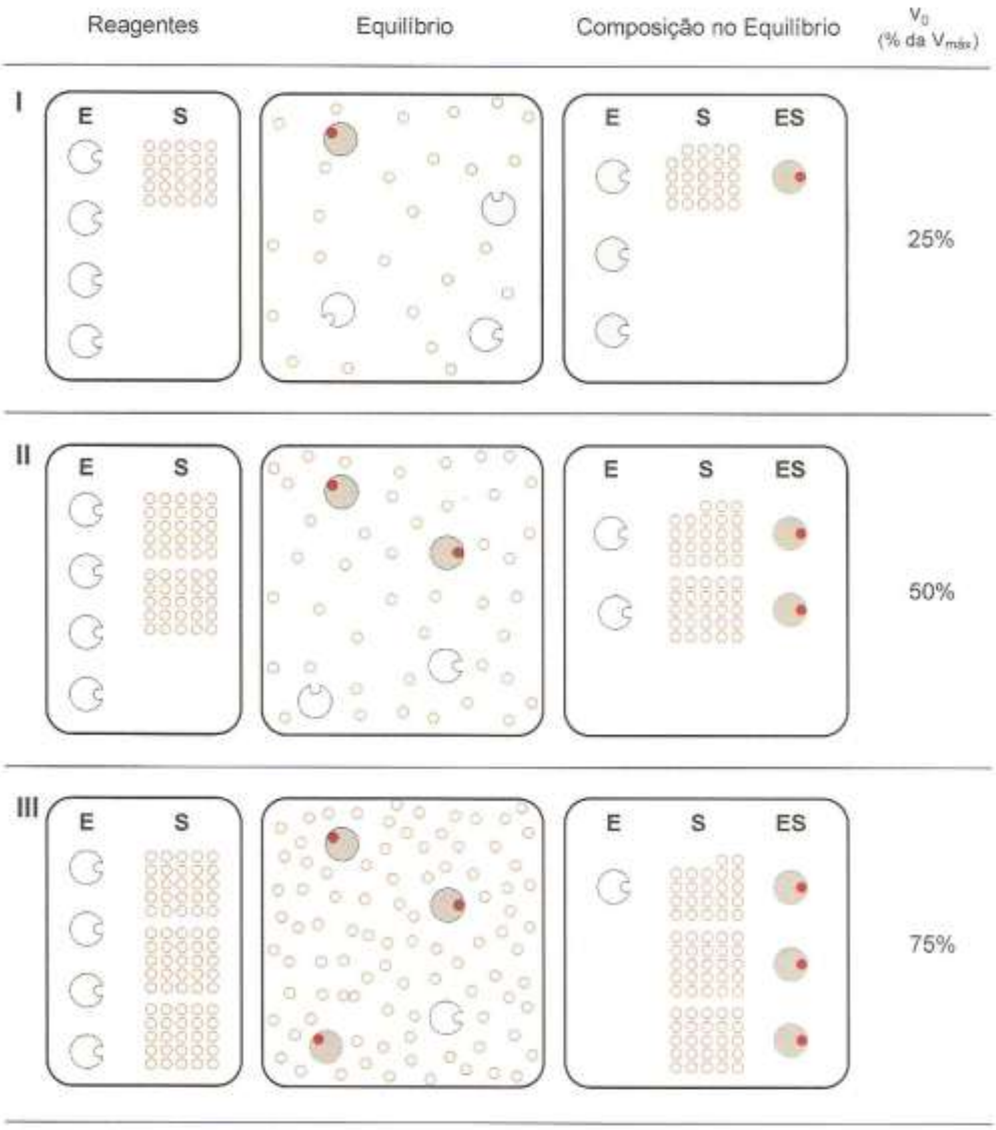


Fig. 5.7 Esquema ilustrativo do equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$, em três situações (I, II, III) de concentrações diferentes de substrato e mesma concentração de enzima, analisadas após um mesmo tempo inicial. As velocidades de reação (v_0) são indicadas em porcentagens da $V_{máx}$. Na prática, a proporção [S]/[E] é muito maior do que a representada no esquema.

tração de substrato foi tal que levou 50% das moléculas de enzimas presentes a estar complexadas com o substrato, formando ES, deixando os outros 50% como enzimas livres, E. A concentração de ES, maior do que no caso anterior, é refletida imediatamente na velocidade de formação do produto (velocidade da reação, expressa em porcentagem da $V_{máx}$), já que

$$v_2 = k_2[ES]$$

Com concentrações maiores de substrato, as velocidades da reação tornar-se-ão cada vez maiores, porque, no equilíbrio da primeira etapa, existirá cada vez mais complexo ES (situação III, Fig. 5.7).

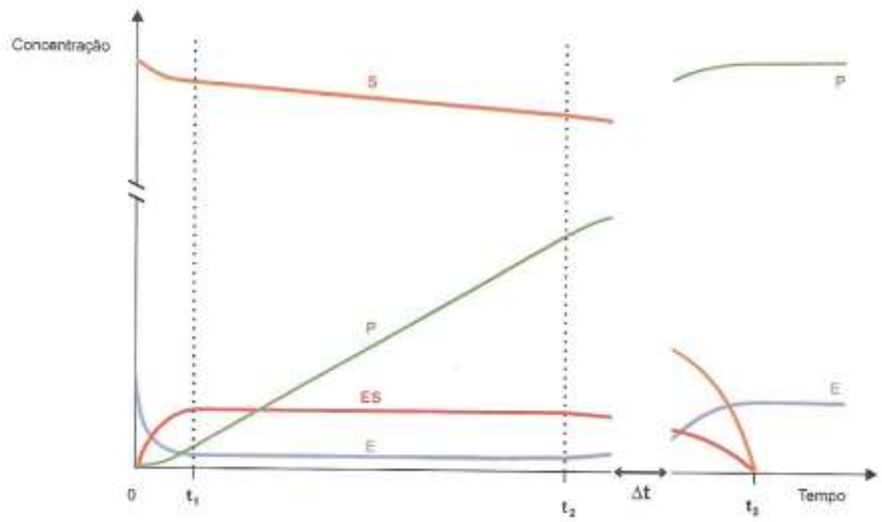


Fig. 5.8 Variação das concentrações dos componentes da reação enzimática em função do tempo. O intervalo $0 - t_1$ é muito pequeno. Após o tempo t_1 estabelece-se o equilíbrio entre E, S e ES, cujas concentrações permanecem aproximadamente constantes até o tempo t_2. A concentração do produto cresce sempre; a concentração do substrato, a rigor, diminui mas pode ser considerada constante face à sua enorme concentração em comparação à da enzima, do complexo ES e do produto. Entre t_1 e t_2 está o tempo inicial, durante o qual a velocidade inicial (v_0) deve ser medida. Durante o intervalo de tempo Δt, a concentração do substrato diminui efetivamente e a reação chega ao final (tempo t_3).

Nas situações I, II e III da Fig. 5.7, as concentrações de E (enzima livre) e de ES, expressas como porcentagem da concentração total de enzima ([E] + [ES]), são:

$$E + S \rightleftharpoons ES$$

	E	ES
I	75%	25%
II	50	50
III	25	75

Se a quantidade de substrato for ainda muito maior do que a prevista na situação III, a concentração de E será praticamente nula, encontrando-se toda a enzima disponível sob a forma de ES:

$$\underset{\cong 0\%}{E} + S \rightleftharpoons \underset{\cong 100\%}{ES}$$

Nestas condições haverá a maior concentração possível de ES, que é praticamente igual à concentração de enzima utilizada, e a reação será processada na maior velocidade possível. Esta concentração de substrato é dita *saturante* e, a partir dela, novos aumentos da concentração de substrato não terão efeito perceptível sobre a velocidade da reação, que atingiu o seu valor máximo, a *velocidade máxima* ($V_{máx}$) da reação. Em resumo, a velocidade da reação é sempre proporcional à concentração de ES, como exemplificado na Fig. 5.7.

Os dados experimentais para a obtenção de um gráfico que relaciona velocidade inicial e concentração de substrato (Fig. 5.9) podem ser conseguidos pelo procedimento seguinte. Monta-se uma série de tubos, todos contendo a *mesma* concentração de enzima mas com concentrações crescentes de substrato. Espera-se o tempo adequado para que se forme uma quantidade mensurável de produto; este tempo, entretanto, deve ser suficientemente pequeno para que menos de 10% do substrato tenham sido transformados em produto (isto garante que a medida de velocidade corresponderá à *velocidade inicial*). Dosado o produto, a velocidade será calculada dividindo-se a quantidade de produto formado pelo tempo. Na curva obtida (Fig. 5.9), podem-se identificar duas regiões:

1. uma região em que a velocidade aumenta com o aumento da concentração de S (pontos A e B), indicando que durante a reação havia moléculas de enzima livres; nesta parte, portanto, a concentração de S é o fator limitante da velocidade da reação;

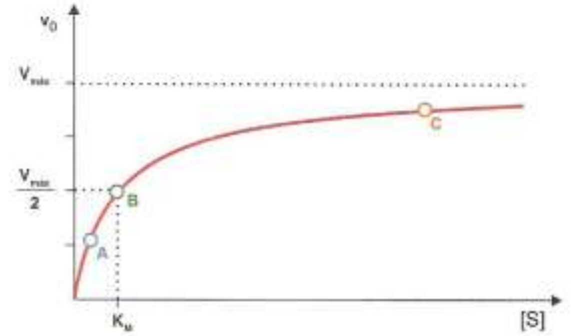


Fig. 5.9 Variação da velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração do substrato (S).

2. uma região em que a velocidade permanece essencialmente constante, apesar do aumento da concentração de S, e se aproxima de $V_{máx}$ (ponto C), indicando que a maioria das moléculas de enzima estiveram ligadas ao substrato durante o tempo em que a velocidade da reação foi medida (*sobre a dificuldade de se determinar o valor de $V_{máx}$ a partir do gráfico da Fig. 5.9, ver* Seção 5.6).

Entre todas as concentrações de substrato, existirá uma determinada concentração que provocará a formação de uma concentração de ES igual à metade da máxima possível. Ou seja, quando se usa esta concentração inicial de substrato, o equilíbrio da primeira etapa está estabelecido com 50% das enzimas sob a forma livre e 50% das enzimas na forma ES (como na situação B da Fig. 5.7).

$$\underset{50\%}{E} + S \rightleftharpoons \underset{50\%}{ES}$$

Nestas condições, a velocidade será, certamente, a metade da $V_{máx}$. Esta específica concentração de substrato corresponde à *constante de Michaelis-Menten*, K_M (Seção 5.6), e apresenta interesse particular, pois seu valor indica a *afinidade* que uma enzima apresenta pelo seu substrato. Por exemplo, a *hexoquinase* aceita como substratos açúcares de seis carbonos (hexoses), como a glicose e a frutose. Para saber por qual das duas hexoses a hexoquinase apresenta maior afinidade, pode-se medir a $V_{máx}$ da reação e a metade desta velocidade, utilizando glicose como substrato, e compará-la com a metade da $V_{máx}$ obtida usando frutose como substrato. No caso em que o substrato é a glicose, a metade da $V_{máx}$ é obtida com concentração do açúcar igual a 0,15 mM. Dito de outra forma, é necessária uma concentração de 0,15 mM de glicose para que metade da enzima disponível encontre-se ligada à glicose, fazendo o complexo Enzima-Glicose. Para conseguir-se situação análoga com frutose, é necessária uma concentração de frutose 10 vezes maior, isto é, 1,5 mM. A hexoquinase tem, portanto, uma afinidade muito maior pela glicose do que pela frutose.

A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima

Deve-se assinalar que, em todas as considerações feitas sobre a variação da velocidade de reação em relação à concentração de substrato, admitiu-se sempre uma concentração *fixa* de enzima. Variando a concentração de enzima, a velocidade *sempre* irá variar qualquer que seja a concentração do substrato, pois se para uma concentração E de enzima obtém-se

$$E + S \rightleftharpoons ES \qquad K_{eq} = \frac{[ES]}{[E][S]}$$

para uma concentração de enzima igual a 2E deve-se ter

$$K_{eq} = \frac{[2ES]}{[2E][S]}$$

É importante lembrar que o substrato está sempre em tal excesso que a quantidade dele que se liga à enzima é desprezível, de modo que

$$[S] - [ES] \cong [S] \quad e \quad [S] - [2ES] \cong [S]$$

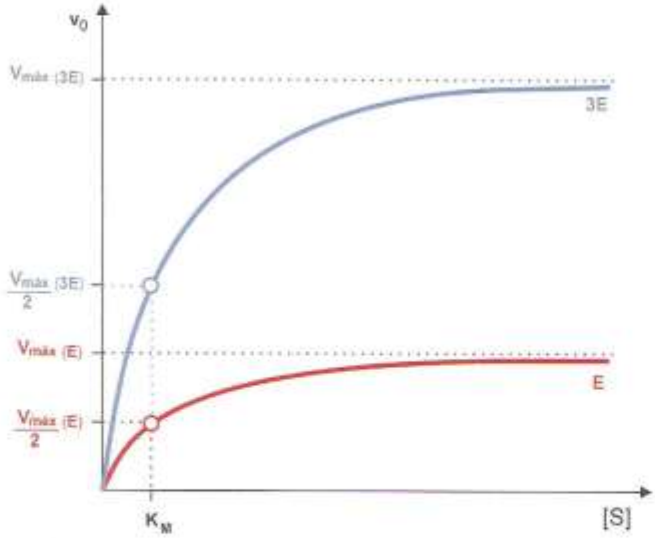


Fig. 5.10 Variação da velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração do substrato (S) para duas concentrações de enzima (E, 3E).

Entretanto, a concentração de ES em um caso é o dobro da outra, e como

$$v_2 = k_2[ES]$$

a velocidade em um caso também será o dobro da outra (Fig. 5.10).

Generalizando, podemos então afirmar que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima (Fig. 5.11). Esta proporcionalidade facilita a determinação da concentração (atividade) de uma enzima; há casos freqüentes em que esta dosagem é útil ou necessária.

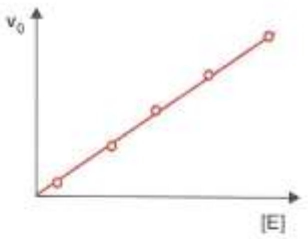


Fig. 5.11 Velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração da enzima (E).

A dosagem de uma enzima é obtida pela medida de sua atividade

As concentrações das soluções são habitualmente expressas em unidades de massa por unidades de volume; para a aferição da massa do soluto presente em soluções de uso corrente na Bioquímica empregam-se vários métodos, sendo a determinação colorimétrica um dos mais freqüentes. As soluções de enzimas constituem um caso especial. Muitas vezes há necessidade de aferir a quantidade de uma enzima presente em soluções que contêm também outras proteínas — é o caso de dosagem de enzimas em plasma sangüíneo e outros fluidos corpóreos ou em extratos celulares. Uma alternativa para esta dosagem seria purificar a enzima, um processo demorado, trabalhoso e, como será visto a seguir, desnecessário. A possibilidade de dosagem colorimétrica de uma dada enzima presente em uma solução contendo outras proteínas está descartada, pela inexistência de um reagente específico para uma dada proteína, porque os reagentes para proteínas atuam sobre todas, já que todas as proteínas têm os mesmos grupos químicos. No caso das enzimas, entretanto, o que verdadeiramente importa é aferir a quantidade de enzimas ativas, ou seja, a atividade

enzimática e não a concentração. Em uma solução de proteínas desnaturadas, a massa da enzima de interesse seria conservada mas a propriedade catalítica estaria perdida.

Em virtude do exposto, a dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, esta medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos, para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas. A velocidade da reação é medida e a atividade enzimática é expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional* (*U*) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura etc.), especificadas para cada caso. As dosagens clínicas de enzimas no plasma e em outros fluidos são geralmente expressas em U/mL ou U/L (Tabela 5.6).

A concentração de enzimas intracelulares no plasma é centenas de vezes menor do que no interior das células, onde são sintetizadas. Em condições patológicas, quando as células são lesadas, suas concentrações plasmáticas tornam-se anormalmente elevadas, revelando a instalação da moléstia. Ainda mais, o tipo de enzima cuja concentração plasmática aumenta pode indicar o tecido ou órgão que sofreu a injúria. Por isto, a dosagem de enzimas no plasma é prática corrente para a elucidação e o acompanhamento de muitos casos patológicos (Tabelas 5.6 e 5.7). A atividade da enzima de interesse no plasma é aferida e comparada com os valores médios encontrados em indivíduos sadios.

Tabela 5.6 Resultados de exames laboratoriais de dosagens de enzimas plasmáticas em dois indivíduos (A e B)

	Atividade enzimática no soro (U/L)		
Enzimas	Indivíduo A	Indivíduo B	Valores de referência
Aldolase	2	2,1	Até 3
Amilase	120	125	60-160
Colinesterase	2.700	3.200	1.900-3.800
Creatina quinase	62	50	10-80
Lactato desidrogenase	398	220	120-240
Fosfatase ácida total	7,3	15,6	4,8-13,5
Fosfatase ácida prostática	2,8	7,7	Até 3,7
Fosfatase alcalina	295	80	50-250
Aspartato transaminase	560	12	Até 18
Alanina transaminase	1.095	18	Até 21
γ-Glutamil transferase	61	11	6-28

Os resultados dos exames do indivíduo A são compatíveis com um quadro de hepatite viral aguda e os dos exames do indivíduo B, com carcinoma de próstata.

Tabela 5.7 Enzimas cujas concentrações plasmáticas são alteradas em determinadas condições patológicas

Enzimas	Moléstias
Transaminases	Hepatite
Creatina quinase, lactato desidrogenase	Enfarte do miocárdio
Amilase, lipase	Pancreatite
Fosfatase alcalina, γ-glutamil transferase	Processos obstrutivos biliares
Fosfatase ácida	Neoplasia de próstata
Creatina quinase	Lesão cerebral grave
Lactato desidrogenase	Anemia hemolítica
Amilase	Parotidite (caxumba)

A medida da atividade enzimática é também imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima. O processo de isolamento de uma enzima é iniciado a partir de um macerado de órgão ou tecido, o extrato celular. Tomando uma amostra deste extrato, deve-se determinar a atividade da enzima em questão (em U/mL, geralmente) e a quantidade total de Unidades presentes no volume total do extrato. Para adotar um parâmetro que permita a comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação, é necessário usar um referencial; a referência habitualmente utilizada é a concentração total de proteína presente na preparação. Define-se, assim, a *atividade específica*, que é o número de Unidades de enzima por miligrama de proteína. A cada etapa processada em direção à purificação da enzima, são feitas novas medidas de atividade e de concentração de proteína e calculada a nova atividade específica. Se a etapa de purificação foi bem-sucedida, a atividade específica encontrada deve aumentar. Este aumento significa, naturalmente, que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejáveis. Novos procedimentos de purificação são efetuados até que, no caso ideal, a atividade específica da preparação torna-se máxima e constante, indicando que a enzima está pura (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 Purificação hipotética de uma enzima

Etapas da purificação	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	U[1]/mL	U totais	U/mg[2]	Purificação[3]
1. Extrato celular	10	80	800	2.000	20.000	25	1
2. Fracionamento por $(NH_4)_2SO_4$	2	120	240	9.000	18.000	75	3
3. Filtração em gel	10	2,2	22	1.620	16.200	750	30
4. Cromatografia de troca iônica	5	2,8	14	2.268	11.340	800	32
5. Cromatografia de afinidade	2	1,1	2,2	5.500	11.000	5.000	200

[1]U: unidade internacional de atividade enzimática. [2]Atividade específica: número de unidades de enzima por miligrama de proteína. Pelos dados apresentados na tabela, observa-se que a etapa 4 não é um método conveniente para a purificação da enzima em questão; esta etapa deveria ser suprimida em tentativas subseqüentes. [3]Purificação: razão entre a atividade específica da etapa considerada e a atividade específica do extrato celular.

5.6 A EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN

A descrição matemática dos fenômenos cinéticos apresentados anteriormente é dada pela *equação de Michaelis-Menten*. Para deduzi-la, será considerada a reação reversível:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Considerando sempre os tempos iniciais de reação, a velocidade de formação de ES a partir de E + P

$$v_{-2} = k_{-2}\,[E]\,[P]$$

pode ser desprezada, pois, como a concentração inicial de P é insignificante em relação a S, o produto não conseguirá ligar-se à enzima, já que a probabilidade de ligação do substrato é muito maior. A própria equação desta velocidade mostra que, quando a concentração de P é próxima de zero, a velocidade v_{-2} também tende a zero.

A velocidade de formação de ES será, portanto, apenas

$$v_1 = k_1\,[E]\,[S]$$

[E] será, na verdade, a concentração de enzima livre, isto é, a diferença entre a concentração adicionada de enzima (ou seja, sua concentração total = E_t) e a concentração de ES (ou seja, a quantidade de enzima ligada ao substrato). Substituindo este valor de [E] na equação de v_1, temos

$$v_1 = k_1\,([E_t] - [ES])\,[S]$$

A velocidade de desaparecimento de ES será a soma de duas velocidades: aquela que dissocia ES em E + S (v_{-1}) e aquela que transforma ES em E + P (v_2):

$$v_{-1} = k_{-1}\,[ES]$$
$$v_2 = k_2\,[ES]$$

Assim, a velocidade de desaparecimento de ES será

$$v_{-1} + v_2 = k_{-1}\,[ES] + k_2\,[ES]$$
$$v_{-1} + v_2 = (k_{-1} + k_2)\,[ES]$$

Durante os tempos de reação considerados iniciais, a concentração de ES mantém-se constante, com o estabelecimento de um equilíbrio estacionário (*steady-state*). As velocidades de formação (v_1) e de desaparecimento ($v_{-1} + v_2$) de ES são, então, iguais.

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$

$$k_1\,([E_t] - [ES]) \cdot [S] = (k_{-1} + k_2)\,[ES]$$

$$([E_t] - [ES]) \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [ES] - [ES] \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES] \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [ES] \cdot [S]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES] \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] \right)$$

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{\dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \qquad \text{Equação (A)}$$

A velocidade inicial da reação total é a velocidade do aparecimento do produto:

$$v_0 = k_2\,[ES]$$

Substituindo, nesta equação, o valor de [ES] da equação (A):

$$v_0 = k_2\,\frac{[E_t][S]}{\dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Neste ponto deve-se lembrar que a velocidade máxima ($V_{máx}$) é obtida quando toda a enzima (E_t) se encontra sob a forma de ES. O produto $k_2\,[E_t]$ é, portanto, a velocidade máxima e

$$v_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{\dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

A relação $(k_{-1} + k_2)/k_1$ foi definida por Michaelis e Menten como uma nova constante, K_M. Chega-se assim à expressão final da equação de Michaelis-Menten:

$$\boxed{v_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_M + [S]}}$$

Quando a concentração de substrato é tal que a velocidade de reação é metade da velocidade máxima (ponto B da Fig. 5.9), resulta:

$$\frac{V_{máx}}{2} = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} + \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$K_M + [S] = 2\,[S]$$

$$K_M = [S]$$

A última igualdade indica que a *constante de Michaelis-Menten é numericamente igual à concentração de substrato que determina a metade da velocidade máxima*, o que permite a fácil determinação experimental dessa constante (Fig. 5.9). O valor do K_M pode indicar o grau de afinidade da enzima pelo substrato (Tabela 5.9), como já foi mencionado.

Tabela 5.9 Constante de Michaelis-Menten de enzimas

Enzima	Substrato	K_M (mM)
Glicerol desidrogenase	Glicerol	39
Anidrase carbônica	CO_2	7,5
Álcool desidrogenase	Etanol	0,5
Isocitrato desidrogenase	Isocitrato	0,45
Hexoquinase	Glicose	0,15
Hexoquinase	Frutose	1,5

A velocidade da reação só é diretamente proporcional a baixas concentrações de substrato

Quando a concentração do substrato é muito inferior ao K_M, $K_M + [S]$ é praticamente igual a K_M, e a equação de Michaelis-Menten se reduz a

$$v_0 = \frac{V_{máx}}{K_M}\,[S]$$

Como $\frac{V_{máx}}{K_M}$ é uma constante, é possível escrever

$$v_0 = K[S]$$

ou seja, uma equação de reta do tipo $y = ax$. Esta equação mostra, portanto, que, com concentrações pequenas de substrato, a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do substrato (região do ponto A no gráfico da Fig. 5.9).

Por outro lado, quando a concentração de S é muito maior do que K_M (região do ponto C da Fig. 5.9), $K_M + [S]$ é praticamente igual a [S] e a equação de Michaelis-Menten fica igual a

$$v_0 = V_{máx}$$

indicando que, quando a concentração de substrato é muito alta (saturante), a velocidade é constante e máxima, independendo da concentração de substrato. Na prática, é muito difícil atingir a $V_{máx}$; ainda assim, é possível estimar seu valor, como analisado a seguir.

Um gráfico com os valores inversos de v_0 e [S] possibilita a determinação de $V_{máx}$ e K_M

A equação de Michaelis-Menten é a equação de uma hipérbole retangular; portanto, os valores exatos de $V_{máx}$ nunca são atingidos, pois a curva tem assíntota no valor $V_{máx}$ do eixo v_0. Mesmo boas aproximações de $V_{máx}$ devem ser obtidas com concentrações tão altas de substrato que são difíceis de conseguir experimentalmente. Como conseqüência, a determinação de K_M também é impossibilitada.

O problema da determinação de $V_{máx}$ e K_M pode, entretanto, ser resolvido com a transformação algébrica da equação de Michaelis-Menten. Esta transformação, formulada por Lineweaver e Burk, é obtida tomando o inverso daquela equação:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{máx}\,[S]}$$

ou

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

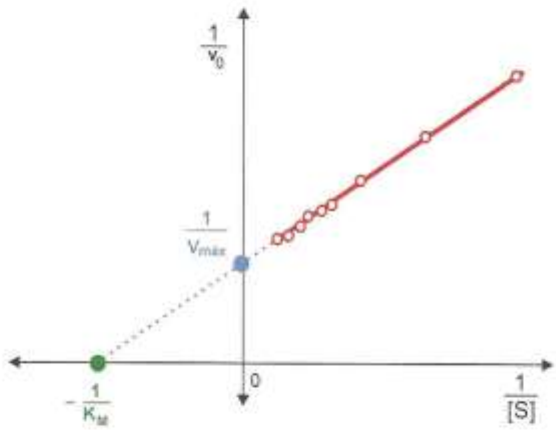


Fig. 5.12 Transformação de Lineweaver-Burk para os resultados de um experimento onde foram preparados tubos contendo diversas concentrações de substrato e a mesma concentração de enzima; após a incubação, mediu-se v_0. Os inversos dos valores das concentrações de substrato utilizadas e os inversos dos valores de v_0 compõem uma reta (linha contínua), que, extrapolada (linha pontilhada), permitem a determinação dos valores de K_M e de $V_{máx}$.

que é uma equação de reta do tipo $y = ax + b$.

Um gráfico com os valores de $\frac{1}{v_0}$ contra valores de $\frac{1}{[S]}$ é, portanto, uma reta cujo intercepto nas ordenadas é $\frac{1}{V_{máx}}$ e, nas abscissas, $-\frac{1}{K_M}$ (Fig. 5.12).

Este gráfico permite aferir $V_{máx}$ sem que seja atingido, na prática, o ponto que equivaleria a esta velocidade, já que a reta pode ser traçada a partir de pontos experimentais conseguidos com concentrações não saturantes de substrato. Prolongando-se a reta, encontra-se o valor do inverso de $V_{máx}$ no intercepto com o eixo das ordenadas e o valor negativo do inverso de K_M, na intersecção com o eixo das abscissas.

Algumas enzimas estão próximas da perfeição catalítica

Para estudar a eficiência da catálise enzimática, define-se a *constante catalítica*, k_{cat}:

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E_t]}$$

A constante catalítica mede, para uma dada concentração de enzima, a eficiência máxima, obtida em condições de $V_{máx}$, quando todas as enzimas estão complexadas com o substrato. Como analisado à Seção 5.6, $V_{máx}$ é igual ao produto k_2 $[E_t]$, ou seja, k_{cat} é igual a k_2:

$$k_2 = \frac{V_{máx}}{[E_t]}$$

k_{cat} é também conhecida como *número de renovação* (*turnover number*) da enzima, porque equivale ao número máximo de moléculas de substrato que um centro ativo converte em produto, por segundo. O valor de k_{cat} indica a rapidez com que uma enzima pode operar, quando todos os centros ativos estão ocupados, ou seja, evidencia com que eficiência o complexo enzima substrato origina produto (Tabela 5.10). A eficiência é espantosa: pelo valor de k_{cat} para a catalase, verifica-se que uma molécula desta enzima é capaz de originar 10.000.000 de moléculas de produto por segundo! Se ao valor de k_{cat} for associado o valor de K_M, pode-se definir uma nova constante k_{cat}/K_M, que relaciona a eficiência catalítica da enzima com a sua afinidade pelo substrato. Um baixo valor de k_{cat}/K_M ocorrerá ou porque a enzima tem pouca afinidade pelo substrato (K_M grande), ou porque a eficiência de gerar produto a partir de ES é pequena (k_{cat} pequeno), ou pelas duas razões somadas. Por outro lado, os maiores valores desta relação serão obtidos satisfazendo simultaneamente a duas condições: alta afinidade da enzima pelo substrato (K_M pequeno) e alta eficiência na transformação de

Tabela 5.10 Algumas enzimas de alta eficiência

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_M(M)	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Superóxido dismutase	1×10^6	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^9$
Catalase	1×10^7	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^8$
Acetilcolinesterase	1×10^4	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
Pepsina (hidrólise de Phe-Gly)	5×10^{-1}	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$

ES em produto (k_{cat} grande). Na Tabela 5.10 aparecem os valores da razão k_{cat}/K_M para várias enzimas. Esta razão para as enzimas mais eficientes aproxima-se muito dos valores do coeficiente de difusão, ou seja, da freqüência de colisão entre enzima e substrato por difusão simples (10^8-10^9 $M^{-1} \cdot s^{-1}$). Isto significa que estas enzimas catalisam a reação com uma eficiência próxima da perfeição: geram produto cada vez que colidem com o substrato. São enzimas que catalisam reações de grande importância para a fisiologia celular, seja na transmissão do impulso nervoso (acetilcolinesterase), na remoção de CO_2 dos tecidos (anidrase carbônica) ou na eliminação de radicais livres de oxigênio (catalase e superóxido dismutase); comparativamente, a pepsina, uma enzima digestiva, é pouco eficiente.

5.7 INIBIDORES ENZIMÁTICOS

A atividade enzimática pode ser diminuída por grande número de substâncias, genericamente chamadas de *inibidores*. Algumas destas substâncias são constituintes normais das células; outras são estranhas aos organismos e sua presença — acidental ou intencional — nas células provoca alterações significativas no metabolismo.

Ao contrário do que possa parecer à primeira vista, os inibidores enzimáticos habitualmente encontrados nas células cumprem um papel regulador importante. A atividade das enzimas sensíveis à sua ação dependerá da concentração do inibidor em um determinado instante. Como estes inibidores são produzidos pelas próprias células, a variação de sua concentração é um recurso por elas largamente empregado no controle da velocidade de muitas reações, permitindo que respondam a mudanças das condições fisiológicas (ver Regulação Alostérica de Enzimas – Seção 19.2.1).

Adicionalmente, o uso *in vitro* de inibidores tem trazido um enorme volume de conhecimento sobre a estrutura das enzimas, a organização do centro ativo, o mecanismo de catálise etc., além de contribuir para a elucidação da seqüência correta das reações que compõem uma via metabólica.

Como a ação enzimática efetivamente controla o metabolismo, a possibilidade de inibir reações enzimáticas é um campo aberto para aplicações farmacológicas. Muitos medicamentos de uso corrente na prática terapêutica baseiam suas propriedades na inibição específica de certas enzimas. Este é o caso das *sulfonamidas* (por exemplo, a *sulfanilamida* – Tabela 5.11), utilizadas no combate a infecções bacterianas. A inibição por estes quimioterápicos se processa sobre uma particular enzima bacteriana, que não existe no organismo do hospedeiro. O bloqueio de uma única reação priva o microrganismo do produto daquela reação, que seria o substrato de uma reação subseqüente. Assim, gradativamente, é afetado um conjunto de reações seqüenciais, tornando a célula incapaz de reproduzir-se. À medida que são melhor conhecidas as enzimas e as reações que catalisam, é sintetizado um número crescente de fármacos destinados a bloquear reações específicas de organismos parasitas ou mesmo reações indesejáveis que se processam no organismo humano em condições patológicas.

As propriedades tóxicas de muitos inibidores têm ainda largo emprego no combate a insetos, por exemplo. Muitos inseticidas têm nos inibidores enzimáticos o seu princípio ativo. É também nesta toxidez que reside o perigo potencial dos detritos industriais, cujo conteúdo em inibidores enzimáticos inespecíficos é capaz de afetar praticamente qualquer ser vivo.

Conquanto exista grande variação quanto aos mecanismos de inibição, podem-se agrupar os inibidores em duas grandes categorias, irreversíveis e reversíveis, segundo a estabilidade de sua ligação com a molécula de enzima.

Os *inibidores irreversíveis* reagem quimicamente com as enzimas, levando a uma inativação praticamente definitiva. Alguns exemplos são os *compostos organofosforados*, que formam ligações covalentes com o grupo OH de resíduos de serina, e a *iodoacetamida* ou o *iodoacetato*, que reagem com o grupo SH de resíduos de cisteína.

$$\boxed{\text{enzima}}{-}CH_2{-}SH + \underset{\text{Iodoacetamida}}{ICH_2{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}NH_2} \longrightarrow \boxed{\text{enzima}}{-}CH_2{-}S{-}CH_2{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}NH_2 + HI$$

Este tipo de inibidor é muito tóxico para os organismos, devido não só à irreversibilidade da sua ligação às enzimas, mas também em virtude de sua inespecificidade. Ligando-se à serina ou cisteína, aminoácidos freqüentes na estrutura de quase todas as proteínas, esses inibidores são, em princípio, capazes de inativar qualquer enzima.

Outro exemplo de inibidor irreversível, porém com propriedades terapêuticas (antiinflamatório, antipirético e analgésico), é a *aspirina* (*ácido acetilsalicílico*, Seção 16.6). A aspirina transfere irreversivelmente seu grupo acetila para o grupo OH de um resíduo de serina da molécula de *ciclooxigenase*, inativando-a (Fig. 5.13). Esta enzima é responsável pela catálise da primeira reação da via de síntese de *prostaglandinas*, substâncias reguladoras de um conjunto grande de processos fisiológicos. A *penicilina* deve seu emprego terapêutico às suas propriedades de inibidor irreversível: este antibiótico liga-se especificamente a enzimas da via de síntese da parede bacteriana, inibindo-as; desprovidas de parede, as células ficam sujeitas à lise. Esta é uma situação ideal, em que o agente terapêutico atua sobre uma enzima que o parasita apresenta e o indivíduo parasitado não.

Os *inibidores reversíveis* são classicamente divididos em dois grupos: os competitivos e os não-competitivos. O critério usado para esta divisão é o estabelecimento (ou não) de competição entre o inibidor e o substrato pelo centro ativo da enzima. A identificação do tipo de inibição pode ser sugerida pela comparação entre a estrutura do inibidor e a do substrato, mas é revelada inequivocamente pela cinética da reação catalisada em presença do inibidor.

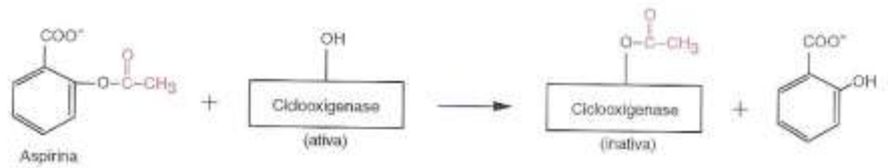


Fig. 5.13 Reação de inativação da ciclooxigenase por reação irreversível com ácido acetilsalicílico (aspirina).

5.7.1 INIBIDORES COMPETITIVOS

Os inibidores competitivos competem com o substrato pelo centro ativo da enzima

Certas moléculas, por apresentarem configuração espacial semelhante à do substrato, são capazes de ligarem-se ao centro ativo da enzima, produzindo um complexo enzima-inibidor semelhante ao complexo enzima-substrato. São os *inibidores competitivos* (I_C).

A constante de equilíbrio da reação

$$E + I_C \rightleftharpoons EI_C$$

é chamada constante do inibidor (K_{I_C}), e mede a afinidade da enzima pelo inibidor, como o K_M mede a afinidade da enzima pelo substrato:

$$K_{I_C} = \frac{[EI_c]}{[E][I_c]}$$

O complexo EI_C *jamais* gera produto e a atividade enzimática, então, estará diminuída de acordo com a fração de enzima que estiver unida ao inibidor. Uma vez que este tipo de inibidor se liga ao mesmo sítio onde se liga o substrato, a ligação do inibidor e a ligação do substrato a uma dada molécula de enzima são eventos mutuamente exclusivos. Quando a molécula da enzima é liberada — ou por dissociação do complexo EI_C ou por decomposição do complexo ES em E + P —, irá associar-se a novas moléculas de substrato ou de inibidor com uma probabilidade que dependerá de suas concentrações relativas e das afinidades relativas entre a enzima e o substrato e entre a enzima e o inibidor. Em concentrações baixas de substrato, em um dado momento, encontrar-se-á uma fração das enzimas associada ao substrato (gerando produto) e uma fração ligada ao inibidor. Como a fração ligada ao substrato certamente será menor do que a que existiria se o inibidor não estivesse presente, a velocidade da reação ficará reduzida. Se a concentração do substrato for muito grande em relação à concentração do inibidor competitivo, a probabilidade de formação do complexo ES é praticamente de 100%, e tudo se passa como se não houvesse inibidor presente no meio de reação. Assim, a velocidade máxima da reação será idêntica à velocidade máxima da reação efetuada na ausência do inibidor, mas só

será obtida com concentrações de substrato maiores do que as da reação não-inibida (Fig. 5.14). Contrariamente, se a concentração do inibidor competitivo for exageradamente alta em relação à concentração do substrato, a probabilidade de a enzima livre ligar-se ao substrato será, praticamente, nula, e a velocidade da reação será zero.

Visto que mesmo na presença de inibidor competitivo a velocidade máxima pode ser atingida, desde que haja grande concentração de substrato, são as velocidades obtidas com concentrações menores de substrato que revelam a inibição. Há, neste caso, uma *aparente* alteração do valor do K_M, que parece maior do que o da reação sem inibidor. É claro, entretanto, que este valor não pode ser usado como uma medida de K_M, cuja determinação deve ser feita na ausência de inibidores. A nova constante, medida em presença de inibidores, é chamada *K_M aparente* (K_M^{ap}).

O valor de K_M^{ap} depende de duas variáveis, que são a afinidade da enzima pelo inibidor, expressa pela constante do inibidor (K_{I_C}), e a própria concentração de inibidor, $[I_C]$. Na presença do inibidor competitivo, a equação da velocidade da reação torna-se igual a

$$v_0 = \frac{V_{máx}\ [S]}{K_M\ (1 + \frac{[I_C]}{K_{I_C}}) + [S]}$$

onde $K_M\ (1 + \frac{[I_C]}{K_{I_C}}) = K_M^{ap}$. Substituindo-se este valor na equação anterior, obtém-se

$$v_0 = \frac{V_{máx}\ [S]}{K_M^{ap} + [S]}$$

que é uma transformação da equação de Michaelis-Menten, na qual o K_M está trocado pelo K_M^{ap}. Fica evidente que as variáveis mencionadas afetam o valor de K_M e não de $V_{máx}$, e que quanto maior a concentração do inibidor competitivo, maior o K_M^{ap} (Fig. 5.14). A transformação de Lineweaver-Burk aplicada a esta equação está apresentada na Fig. 5.16. A comparação do valor de K_M^{ap} com o valor do K_M tem muita utilidade na determinação do tipo de inibidor — competitivo ou não-competitivo (Seção 5.7.2).

Um exemplo clássico deste tipo de inibição é a ação de *malonato* sobre a reação catalisada pela *succinato desidrogenase* (Tabela 5.11). Tendo estrutura semelhante ao succinato, o malonato inibe competitivamente a succinato desidrogenase. Outros compostos, semelhantes ao succinato, são também inibidores da enzima.

Os inibidores competitivos têm largo emprego terapêutico (Tabela 5.11), porque inibem reações que ocorrem específica ou preferencialmente no organismo parasita (bactérias ou vírus). É o que acontece com a *sulfanilamida*, que inibe a síntese bacteriana da coenzima tetraidrofolato e o *AZT* (*3'-azido-2'-desoxitimidina*), um inibidor da DNA polimerase (transcriptase reversa), necessária para a replicação do vírus *HIV* (de ***Human Immunodeficiency Virus***), causador da *AIDS* (de *Acquired Immune Deficiency Syndrome*). Os inibidores competitivos são ainda utilizados na quimioterapia de diversos tipos de câncer. Neste caso, a célula neoplásica comporta-se como o agressor do organismo; seu metabolismo é diferente do da célula normal sob vários aspectos, incluindo uma velocidade de multiplicação muito

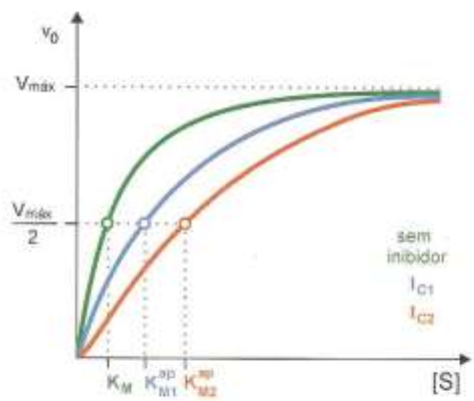
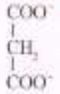
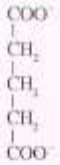
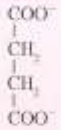
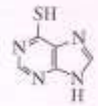
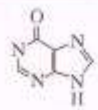
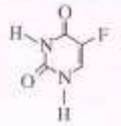
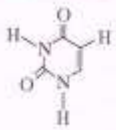
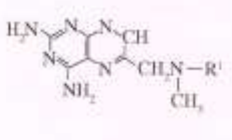
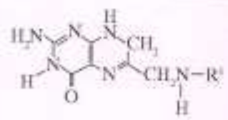
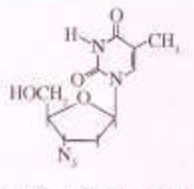
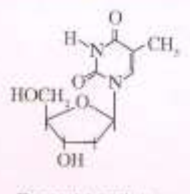
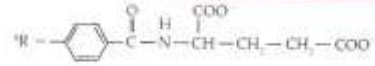


Fig. 5.14 Efeito de duas concentrações de inibidor competitivo ($I_{C1} < I_{C2}$) sobre a velocidade da reação enzimática. K_{M1}^{ap} e K_{M2}^{ap} são valores do K_M aparente para as concentrações I_{C1} e I_{C2} de inibidor, respectivamente.

Tabela 5.11 Inibidores competitivos de algumas enzimas, seus substratos naturais e as moléstias em cujo tratamento são empregados

Inibidor	Substrato	Enzima	Moléstia
 Malonato  Glutarato	 Succinato	Succinato desidrogenase	—
 Sulfanilamida	 p-Aminobenzoato	Diidropteroato sintase	Infecções bacterianas
 6-Mercaptopurina	 Hipoxantina	Adenilossuccinato sintase	Leucemia
 5-Fluorouracila	 Uracila	Timidilato sintase	Tumores
 Metotrexato	 Diidrofolato	Diidrofolato redutase	Leucemia
 AZT (3′-azido-2′-desoxitimidina)	 Desoxitimidina	DNA polimerase viral	AIDS



maior. Por isto, drogas que afetam reações enzimáticas normais e imprescindíveis às células em geral atuarão mais intensamente sobre as células cancerosas; também serão atingidos alguns tecidos normais que se dividem rapidamente, como a medula óssea (que produz as células sangüíneas), a mucosa intestinal, os folículos capilares, as células germinativas masculinas etc. O alvo de escolha para a atuação dessas drogas é o processo de replicação do DNA, em suas várias etapas; alguns exemplos são 6-mercaptopurina e 5-fluorouracila, que impedem a síntese das bases purínicas e pirimidínicas, respectivamente. Um número crescente de drogas estão sendo planejadas estruturalmente, sintetizadas

e testadas segundo esta abordagem farmacológica, que constitui uma grande esperança para o controle de moléstias até agora incuráveis.

5.7.2 INIBIDORES NÃO-COMPETITIVOS

Os inibidores pertencentes a esta classe não guardam qualquer semelhança estrutural com o substrato da reação que inibem. Seu efeito é provocado por ligação a radicais que não pertencem ao centro ativo; esta ligação altera a estrutura enzimática a tal ponto que inviabiliza a catálise. O ponto de ligação do inibidor não-competitivo (I_{NC}) é a cadeia lateral de um aminoácido — o grupo OH de serina ou o grupo SH de cisteína, por exemplo. Como esses grupos são freqüentes nas enzimas, a ação de inibidores não-competitivos é bastante inespecífica, o mesmo inibidor podendo atuar sobre um grande número de enzimas (ao contrário do que ocorre com os inibidores competitivos).

A reação do inibidor não-competitivo com a enzima pode ser representada por:

$$E + I_{NC} \rightleftharpoons EI_{NC}$$

Vê-se pelo equilíbrio que, embora o inibidor não-competitivo não esteja sempre ligado à *mesma* molécula de enzima, um determinado percentual de moléculas de enzima está sempre ligado ao inibidor, e portanto ela está inativa. O que diferencia este tipo de inibidor dos inibidores irreversíveis é que, no caso destes últimos, uma molécula enzimática ligada ao inibidor está *definitivamente* inativada, enquanto, no caso dos inibidores reversíveis não-competitivos, uma molécula de enzima, que em um instante está ligada ao inibidor (inativa), pode encontrar-se livre (ativa) em um momento seguinte. Sendo assim, o fato de a ligação do inibidor não-competitivo à molécula de enzima ser reversível não diminui seu poder de ação.

Na presença de um inibidor não-competitivo, tudo se passa como se efetivamente houvesse uma concentração menor de enzimas, e, uma vez que a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de enzimas ativas, a velocidade de reação será menor do que na ausência do inibidor para *qualquer* concentração de substrato; é claro que a velocidade máxima da reação também será reduzida. Ainda mais, uma vez que o substrato e o inibidor não-competitivo não competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, aumentos na concentração do substrato *não* podem anular ou mesmo atenuar o efeito do inibidor.

Como o sítio de ligação do inibidor não-competitivo é diferente do sítio ativo, em alguns casos é possível a ligação concomitante de inibidor e substrato, formando um complexo ternário ESI_{NC}, incapaz de gerar produto. As características descritas permitem prever, para o inibidor não-competitivo (Fig. 5.15), uma cinética diferente da do inibidor

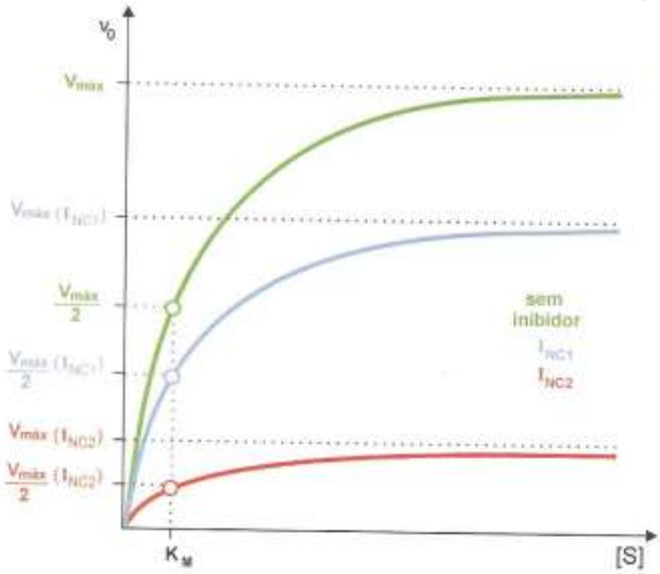


Fig. 5.15 Efeito de duas concentrações de inibidor não-competitivo ($I_{NC1} < I_{NC2}$) sobre a velocidade da reação enzimática. O valor do K_M permanece inalterado, mas as velocidades máximas decrescem com o aumento da concentração do inibidor.

competitivo. Além disso, com inibidores não-competitivos, o valor do K_M aparente coincide com o valor do K_M. Isto porque as velocidades medidas resultam da ação de enzimas que não estão ligadas ao inibidor. Estas enzimas comportam-se como se estivessem na ausência do inibidor e, portanto, conservam exatamente a mesma afinidade pelo seu substrato (da qual o K_M é uma medida).

No caso da inibição não-competitiva, a constante de dissociação do complexo EI_{NC} e a própria concentração do inibidor interferem no valor de $V_{máx}$, e não no de K_M, ao contrário do que ocorre com o inibidor competitivo. A equação de Michaelis-Menten passa a ser

$$v_0 = \frac{\dfrac{V_{máx}}{1 + \dfrac{[I_{NC}]}{K_{INC}}}[S]}{K_M + [S]}$$

A Fig. 5.16 apresenta a transformação de Lineweaver-Burk aplicada a esta equação, em comparação com as transformações para a cinética da reação na presença de inibidor competitivo e na ausência de inibidores.

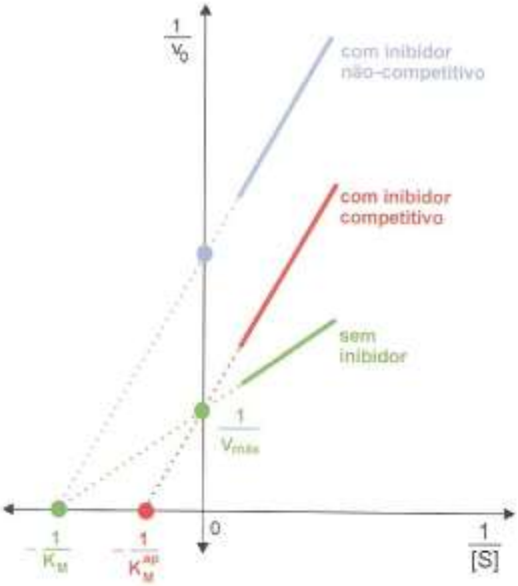


Fig. 5.16 Transformação de Lineweaver-Burk para a reação enzimática sem inibidor e em presença de inibidores competitivo e não-competitivo.

São exemplos de inibidores não-competitivos os metais pesados como Hg^{2+}, Pb^{2+} e Ag^{+}, que reagem com os grupos SH das proteínas. Como já foi assinalado, a inibição não-competitiva, por ser pouco específica, tem amplo espectro de ação, o que torna a ingestão destes inibidores, direta ou indiretamente (por alimentos contaminados, derivados de animais ou vegetais), extremamente tóxica. Muitos casos registrados de intoxicação por Hg^{2+} ocorrem em mineração de ouro, onde o mercúrio é usado em uma das etapas da extração do metal. Por outro lado, o despejo de resíduos deste processo em rios é uma fonte considerável de poluição ambiental.

Análogos de substratos são "venenos" naturais ou medicamentos

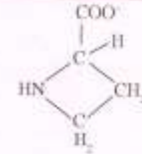
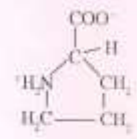
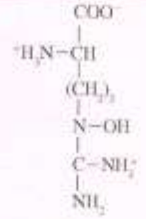
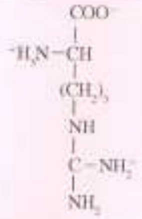
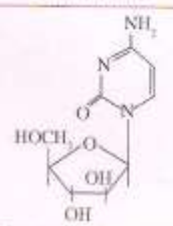
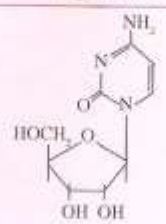
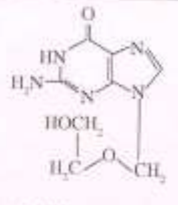
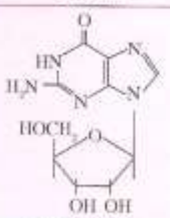
Uma classe importante e extremamente variada de compostos tem sua ação relacionada à atividade enzimática. São os *antimetabólitos* ou *análogos de substratos*, que, como o nome indica, têm fórmula estrutural semelhante à de substratos naturais, ligam-se ao centro ativo e, ao contrário dos inibidores competitivos, geram produtos. Estes produtos são, evidentemente, diferentes do produto gerado pelo substrato e não prosseguem na seqüência metabólica normal, por

não serem aceitos como substrato pela enzima seguinte, ou por serem instáveis, ou por qualquer outro motivo. Por conseqüência, a via metabólica sobre a qual interferem fica interrompida.

Muitos antimetabólitos são de ocorrência natural e constituem, muitas vezes, um mecanismo de defesa de vegetais contra a ingestão de suas folhas e sementes por insetos, pássaros e mamíferos. É comum em plantas a presença de análogos de aminoácidos, sendo conhecidos mais de 300 destes compostos. Alguns exemplos são *azetidina 2-carboxilato* e *canavanina*, respectivamente análogos de prolina e arginina (Tabela 5.12). Estes análogos são incorporados no lugar dos aminoácidos "certos" e a proteína resultante é inativa. Certas plantas venenosas contêm *fluoroacetato*, um análogo de acetato. Este composto, extremamente tóxico, é transformado em fluoroacetil-coenzima A e substitui a acetil-coenzima A na condensação com oxaloacetato (primeira reação do ciclo de Krebs), originando fluorocitrato. A enzima seguinte do ciclo, a aconitase, não reconhece fluorocitrato como substrato e o ciclo é interrompido. Recentemente, foram constatados muitos casos letais de envenenamento de animais no Zoológico de São Paulo por fluoroacetato, componente de venenos contra ratos, atualmente de comercialização proibida.

Um número crescente de quimioterápicos é constituído por análogos de substratos, particularmente utilizados no tratamento de câncer; é o caso de *citosina arabinosídio*, inserido no DNA em lugar de citosina. A *acicloguanosina*, empregada no combate ao vírus herpes, é introduzida pela DNA polimerase do vírus no seu DNA (no lugar de guanosina) mas não é reconhecida pela DNA polimerase da célula hospedeira, residindo nesta diferença a sua eficácia.

Tabela 5.12 Antimetabólitos e os substratos que substituem

Antimetabólitos	Substratos
 Azetidina 2-carboxilato	 Prolina
 Canavanina	 Arginina
 Citosina arabinosídio	 Citidina
 Acicloguanosina	 Guanosina

5.8 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A coordenação das numerosas vias metabólicas presentes nas células, a capacidade de responder adequadamente a mudanças no meio ambiente, o crescimento e a diferenciação harmônicos do organismo são resultantes da possibilidade de regular a ação enzimática. Basicamente, existem dois mecanismos para a modulação da atividade enzimática:

1. Controle da disponibilidade de enzimas, exercido sobre as velocidades de síntese e de degradação das enzimas, que determinam sua concentração celular. ***A interferência hormonal sobre o nível de enzimas-chave do metabolismo encontra-se descrita nos Capítulos 19 e 20.***
2. Controle da atividade da enzima, efetuado por mudanças estruturais da molécula enzimática e que redundam em alterações da velocidade de catálise. ***Estas alterações são obtidas por*** **regulação alostérica** *e* **modificação covalente** ***e serão analisadas nos Capítulos 19 e 20.***

Outros dois processos de regulação enzimática, de ocorrência mais restrita, estão descritos a seguir.

Algumas enzimas são sintetizadas em uma forma inativa, o zimogênio

Certas enzimas, cujo local de ação é extracelular (plasma, trato digestório), são sintetizadas na forma de precursores inativos, chamados *zimogênios*. Para que um zimogênio adquira propriedades de enzima, é necessário que haja hidrólise de determinadas ligações peptídicas, com a conseqüente remoção de um segmento da cadeia de aminoácidos. A cadeia polipeptídica remanescente adquire nova estrutura espacial, onde é organizado um centro ativo funcional.

Várias enzimas proteolíticas, como *pepsina* e *quimiotripsina*, são sintetizadas como zimogênios e assim mantidas enquanto estão armazenadas em suas células de origem, sem risco de haver digestão das proteínas celulares. A transformação zimogênio → enzima processa-se fora destas células, no local onde a atividade digestiva deve ser exercida. Este é o caso de *pepsinogênio*, que origina pepsina na cavidade gástrica, por remoção de 42 resíduos de aminoácidos, sob a ação de íons H^+. A própria pepsina formada catalisa a conversão de novas cadeias de pepsinogênio em pepsina. Analogamente, *tripsinogênio* e *quimiotripsinogênio*, de origem pancreática, são transformados em tripsina e quimiotripsina no intestino delgado, sob a ação de enzimas hidrolíticas específicas.

Isoenzimas são formas diferentes de uma mesma enzima

Existem enzimas que catalisam a mesma reação mas que apresentam estruturas diversas, dependendo do tecido ou organela em que ocorrem em um organismo — são as *isoenzimas*. Frente a uma determinada situação fisiológica, as isoenzimas de órgãos distintos podem tornar-se ativas ou inativas, permitindo a resposta adequada do particular órgão onde se localizam (ver exemplos na Seção 20.2). Adicionalmente, o padrão característico de isoenzimas nos tecidos tem grande utilidade na prática médica: a detecção de um tipo de isoenzima no plasma e, conseqüentemente, a identificação do seu tecido de origem é um procedimento largamente empregado no diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças. Freqüentemente, as isoenzimas resultam de combinações diferentes de subunidades comuns. A *lactato desidrogenase* (*LDH*, de *lactate* ***dehydrogenase***), por exemplo, é constituída por quatro subunidades de dois tipos: subunidade H (de **H**eart, coração em inglês) e M (de **M**úsculo), que podem associar-se de maneiras variadas. As formas HHHH e HHHM são abundantes no coração, enquanto a forma MMMM predomina em músculos esqueléticos e fígado. Outros tecidos apresentam diferentes composições de subunidades.

5.9 COFATORES ENZIMÁTICOS

Cofatores são imprescindíveis para a atividade de inúmeras enzimas

A maioria das enzimas necessitam da associação com outras moléculas ou íons para exercer seu papel catalítico. Esses componentes da reação enzimática são genericamente chamados *cofatores*. Os cofatores podem ser *íons metálicos* ou moléculas orgânicas, não-proteicas, de complexidade variada, que recebem o nome de *coenzimas*.

Íons metálicos como Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+} e Co^{2+} costumam fazer parte da estrutura da enzima ou por ligarem-se fortemente a cadeias laterais de aminoácidos, freqüentemente pertencentes ao sítio ativo da enzima, ou por estarem presentes em grupos prostéticos como, por exemplo, o heme. Outros íons metálicos como Na^+, K^+, Mg^{2+}, Mn^{2+} e Ca^{2+} associam-se fraca e reversivelmente à enzima. Os íons metálicos participam diretamente da catálise, por diversos mecanismos, atuando como catalisadores ácidos, mediadores de reações de óxido-redução (Capítulo 11), de hidroxilação

(Seção 17.3) etc.; podem, ainda, modificar a forma do centro ativo, aumentando sua afinidade pelo substrato. Alternativamente, em vez de associar-se à enzima, o íon metálico pode ligar-se ao substrato ou à coenzima — somente esta associação é reconhecida pela enzima. É o caso, por exemplo, de reações catalisadas por quinases, que utilizam como coenzima o complexo ATP-Mg^{2+}: na ausência de Mg^{2+}, o ATP não se liga à enzima.

As coenzimas atuam como aceptores de átomos ou grupos funcionais retirados do substrato em uma dada reação e como doadores destes mesmos grupos ao participarem de uma outra reação e, por isto, diz-se que as coenzimas são transportadoras de determinados grupos (Tabela 5.13). Durante a catálise, coenzima e substrato acham-se alojados no centro ativo da enzima, consistindo a reação na remoção de determinado grupo químico do substrato e sua transferência para a coenzima, ou vice-versa. Fica evidente que as coenzimas não apenas sofrem modificações em sua estrutura ao participar de uma reação enzimática, mas são necessárias em quantidades estequiométricas em relação ao substrato. Todavia, o fato de as coenzimas estarem sendo constantemente recicladas, oscilando entre duas formas, permite que suas concentrações celulares possam ser bastante reduzidas, muito menores do que as concentrações de substrato.

Nem sempre é imediata a diferença entre substrato e coenzima. No entanto, um critério diferencial é o fato de o substrato sofrer novas alterações nas reações metabólicas subseqüentes, enquanto a coenzima volta à sua forma original em outra reação. A reação que modifica a coenzima e a reação que restaura sua forma original são catalisadas por enzimas diferentes e específicas, que têm em comum apenas o fato de utilizarem a mesma coenzima. Além disso, na maior parte das reações, a ligação da coenzima à enzima precede a ligação do substrato à enzima.

Em alguns casos, a coenzima encontra-se covalentemente ligada à molécula enzimática, constituindo, portanto, um grupo prostético da proteína; em outros casos, a coenzima é uma molécula "livre", reunindo-se à enzima apenas no momento da catálise. Duas coenzimas transportadoras de hidrogênio podem servir como exemplo das duas possibilidades: a flavina adenina dinucleotídio (FAD) aparece sempre como grupo prostético de enzimas, enquanto a nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) é geralmente livre, podendo atuar como coenzima de uma série de enzimas.

A estrutura química das coenzimas é bastante variável. Algumas coenzimas, como o ATP e o GTP, são integralmente sintetizadas pelas células. Outras apresentam em sua molécula um componente orgânico que não pode ser sintetizado pelos animais superiores. Este componente, ou um seu precursor, deve então ser obtido da dieta, constituindo uma *vitamina*. As vitaminas são compostos orgânicos indispensáveis ao crescimento e às funções normais dos animais superiores. Ao contrário de carboidratos, proteínas e lipídios, são requeridos na dieta em pequenas quantidades (microgramas ou miligramas diários), já que são precursores de coenzimas, cujas concentrações celulares são muito pequenas, por serem constantemente recicladas, como foi descrito. As necessidades vitamínicas diferem segundo as espécies. A *vitamina C* (*ácido ascórbico*), por exemplo, é necessária a poucos animais além dos primatas — a maioria é dotada de vias metabólicas capazes de levar à produção do ácido ascórbico, que, assim, deixa de ser uma vitamina para esses animais. Além desta vitamina, o homem precisa de várias outras, sintetizadas por plantas ou microrganismos. Em outro extremo, *Escherichia coli*, uma bactéria comum no trato intestinal humano, é capaz de multiplicar-se em uma solução contendo apenas uma fonte de carbono (glicose, por exemplo), uma fonte de nitrogênio (NH_4^+, por exemplo) e sais minerais. A partir destas substâncias, é capaz de sintetizar todos os compostos necessários à sua manutenção e reprodução, inclusive aqueles que, para os animais superiores, constituem-se em vitaminas.

As vitaminas são classicamente divididas em *hidrossolúveis*, que incluem as vitaminas do complexo B (Tabela 5.13) — tiamina (vitamina B_1), riboflavina (B_2), nicotinamida (B_3), ácido pantotênico (B_5), piridoxina (B_6), biotina (B_7), ácido

Tabela 5.13 Grupos transportados por coenzimas e vitaminas presentes em suas moléculas

Coenzima	Grupo transportado	Vitamina
Adenosina trifosfato (ATP)	Fosfato	—
Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeído	Tiamina (B_1)
Flavina adenina dinucleotídio (FAD)	Hidrogênio	Riboflavina (B_2)
Coenzima A	Acila	Ácido pantotênico (B_5)
Nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+)	Hidreto	Nicotinamida (B_3)
Piridoxal-fosfato	Amino	Piridoxina (B_6)
Biotina	CO_2	Biotina (B_7)
Tetraidrofolato	Carbono	Ácido fólico (B_9)
Metilcobalamina	Metil	Cobalamina (B_{12})

fólico (B_9), cobalamina (B_{12}) e o ácido ascórbico (C), e *lipossolúveis* — as vitaminas A, D, E e K. São as vitaminas hidrossolúveis as que têm função de coenzimas ou fazem parte de moléculas de coenzimas. A participação das vitaminas lipossolúveis nas reações metabólicas é muito menos conhecida.

As estruturas das vitaminas e coenzimas serão apresentadas ao longo do estudo do metabolismo, à medida que forem sendo descritas as reações das quais participam.

BIBLIOGRAFIA

Bruice TC, Benkovic SJ: Chemical basis for enzyme catalysis. *Biochemistry* **39**:6267-6274, 2000.

Burtis CA, Ashwood ER (editors): *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 5th ed. W.B. Saunders Company, 2001.

Cornish-Bowden A: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 3rd ed. Portland Press, 2004.

Cornish-Bowden A, Cardenas ML: Metabolic analysis in drug design. *C R Biol* **326** (5):509-515, 2003.

Dixon M, Webb E: *Enzymes*, 3rd ed. Longman Group Limited, 1979.

Eisenthal R, Danson M (editors): *Enzyme Assays: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford University Press, 2002.

Fersht A: *Structure and Mechanism in Protein Science: a Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, 3rd ed. W.H. Freeman & Company, 1998.

Harman JG et al (editors): *Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill, 2000.

Laidler KJ, Bunting PS: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, 2nd ed. Clarendon Press, 1973.

Marangoni AG: *Enzyme Kinetics. A Modern Approach*. Wiley-Interscience, 2002.

Michaelis L, Menten ML: *Biochem Z* **49**:333, 1913.

Purich DL (editor): *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism*, 2nd ed. Academic Press, 1996.

Segel IH: *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems*. Wiley-Interscience, 1993.

PARTE 2

ESTRUTURA DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS; MEMBRANAS

6

Estrutura de Carboidratos e Lipídios

6.1 ESTRUTURA DE CARBOIDRATOS

Os *carboidratos* (ou *hidratos de carbono*) são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou substâncias que, hidrolisadas, originam estes compostos. Apresentam, em geral, a fórmula empírica $(CH_2O)_n$, da qual deriva a sua nomenclatura, que, todavia, é inadequada: muitos carboidratos não apresentam essa fórmula geral (como a glicosamina e outros carboidratos que contêm grupos amino) e existem compostos com essa fórmula que não são carboidratos (ácido lático, por exemplo). Carboidratos com sabor doce, como sacarose, glicose e frutose, comuns na alimentação humana, são chamados *açúcares*.

Monossacarídios constituem o tipo mais simples de carboidrato, chamados *aldoses* ou *cetoses*, segundo o grupo funcional que apresentam, aldeído ou cetona. De acordo com seu número de átomos de carbono, são designados trioses, tetroses, pentoses, hexoses ou heptoses. Há duas trioses: o gliceraldeído, uma aldotriose, e a diidroxiacetona, uma cetotriose. O gliceraldeído apresenta um carbono (C_2) assimétrico, dando origem a dois isômeros: D e L. Os outros monossacarídios são teoricamente derivados dessas duas trioses; os que são biologicamente importantes apresentam, sempre, configuração D, ou seja, têm a hidroxila do carbono assimétrico mais distante do carbono 1 em posição idêntica à do D-gliceraldeído.

Alguns dos monossacarídios mais comuns estão representados na Fig. 6.1. Na verdade, aquelas representações lineares são apenas didáticas, porque as ligações entre os carbonos presentes na molécula não têm ângulos de 180°, mas muito menores. Resultam, então, "dobramentos" da cadeia de carbonos, que aproximam uma das hidroxilas ao grupo carbonila (C = O), presente tanto nas aldoses como nas cetoses. Esta aproximação propicia a reação entre os dois grupos[1], resultando numa estrutura cíclica, encontrada em todos os monossacarídios com mais de quatro átomos de carbono. No caso da molécula de glicose, a ligação é feita com a hidroxila ligada ao carbono 5, ficando o carbono 6 excluído do anel (Fig. 6.2). Na estrutura resultante, o carbono 1 torna-se assimétrico, possibilitando a existência de dois isômeros, nos quais a hidroxila ligada a esse carbono pode ficar situada abaixo ou acima do plano do anel; as formas correspondentes são designadas α e β, respectivamente. Esta nomenclatura é também utilizada para a forma cíclica da frutose, referindo-se, entretanto, à configuração do carbono 2. As formas α, β e aberta mantêm-se em equilíbrio nas soluções, havendo grande predomínio das formas cíclicas sobre a forma aberta, que aparece em pequena proporção, menos do que 1%.

---

[1] Alcoóis podem reagir com o grupo carbonila de aldeídos ou de cetonas formando *hemiacetais* ou *hemicetais*, respectivamente. Nos monossacarídios, a reação intramolecular de um grupo hidroxila com um grupo aldeído (de uma aldose) ou com um grupo cetona (de uma cetose) forma um hemiacetal ou um hemicetal, cíclicos.

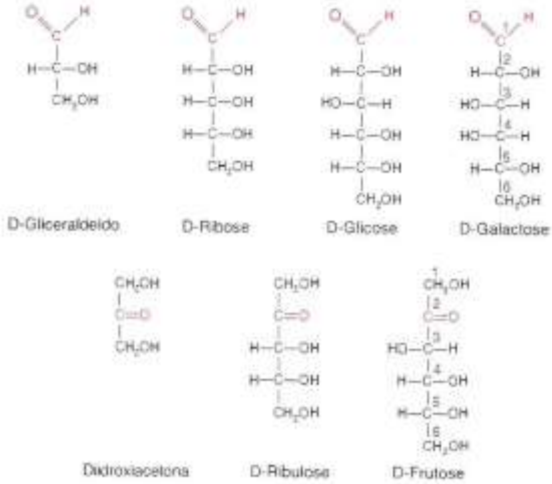


Fig. 6.1 Estrutura de alguns monossacarídios.

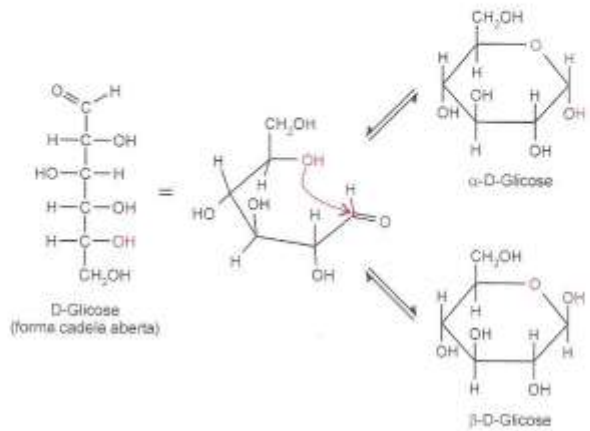
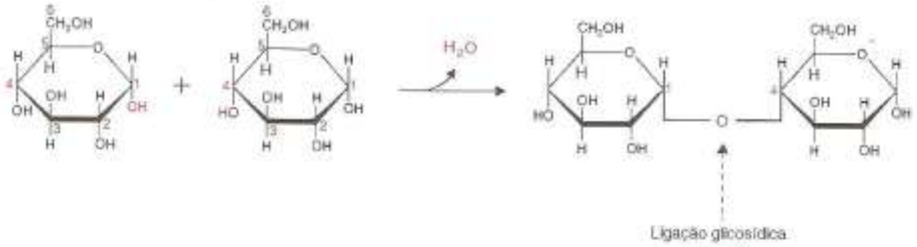


Fig. 6.2 Conversão da forma em cadeia aberta da molécula de glicose na forma cíclica — o grupo hidroxila do carbono 5 reage com o grupo aldeído, formando um hemiacetal cíclico, que pode existir como dois isômeros, α e β.

Oligossacarídios são carboidratos formados por um pequeno número de monossacarídios unidos por ligações glicosídicas. Estas ligações são, teoricamente, formadas entre duas hidroxilas de duas moléculas de monossacarídios, pela exclusão de uma molécula de água:



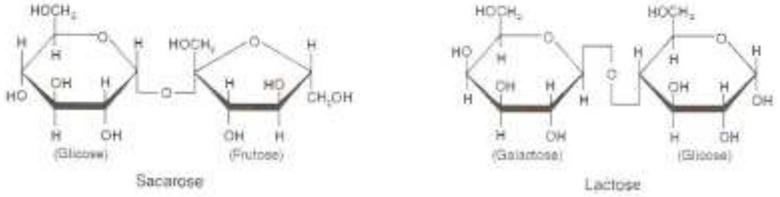


Fig. 6.3 Estrutura dos dois dissacarídios mais comuns.

Da mesma forma que a ligação peptídica não se forma diretamente entre dois aminoácidos, a ligação glicosídica não se forma diretamente entre dois monossacarídios. A equação representada pelo esquema anterior apenas resume um processo composto de várias reações. A ligação glicosídica esquematizada é designada *α-1,4* por ter sido estabelecida entre o carbono 1, com configuração α, e o carbono 4.

Entre os oligossacarídios, os mais comuns são os *dissacarídios*, que incluem a *sacarose* — formada por glicose e frutose, unidas por ligação α-1,2 — e a *lactose*, constituída de glicose e galactose, unidas por ligação β-1,4 (Fig. 6.3).

Polissacarídios são polímeros constituídos de centenas ou milhares de resíduos de monossacarídios, mais comumente a glicose. Podem formar cadeias lineares, como na *celulose*, ou cadeias ramificadas, como no *amido* e no *glicogênio*. Na celulose, as unidades de glicose são unidas por ligações glicosídicas entre os carbonos 1 (com configuração β) e 4: ligações β-1,4. O amido e o glicogênio contêm cadeias similares, com grau de ramificação maior no glicogênio. A organização supramolecular das cadeias para formar grânulos é, todavia, totalmente diferente nos dois polissacarídios.

O amido é composto de duas frações: *amilose* e *amilopectina*, que correspondem, respectivamente, a cerca de 20 e 80% do amido na maioria das plantas. A amilose é composta por cadeias lineares de resíduos de glicose unidos pelos carbonos 1 (com configuração α) e 4: ligações α-1,4. A amilopectina, a fração principal, contém cadeias lineares semelhantes à amilose, mas mais curtas, com 24-30 unidades de glicose, e contendo ramificações formadas por ligações entre os carbonos 1 e 6 (ligações α-1,6). Uma das extremidades da amilopectina é chamada *redutora*, por ter o resíduo de glicose com o carbono 1 (do grupo aldeído, redutor) livre; as inúmeras extremidades restantes são chamadas *não-redutoras*, porque têm resíduos de glicose com o carbono 1 comprometido em ligações glicosídicas α-1,4 (Fig. 6.4 a). As cadeias de amilopectina organizam-se em estruturas de complexidade crescente, formando uma matriz semicristalina à qual se associam as cadeias de amilose, e que resultam na construção do grânulo de amido. Grânulos de amido são depositados nas células vegetais em cloroplastos, onde ocorre a fotossíntese, e em amiloplastos, organelas especializadas em armazenar o polissacarídio.

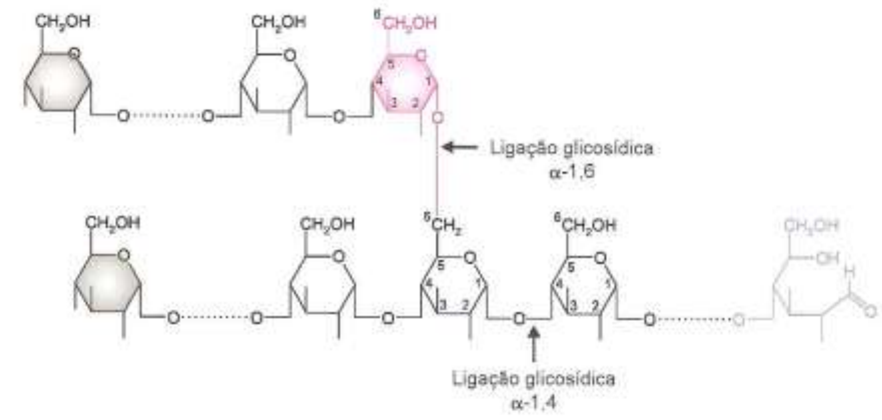
As cadeias da molécula de glicogênio assemelham-se às da amilopectina, embora sejam mais ramificadas: contêm, em média, 13 resíduos de glicose e duas ramificações por cadeia. Como na amilopectina, as unidades de glicose estabelecem ligações α-1,4 nos segmentos lineares, e ligações α-1,6 nas ramificações. O glicogênio também apresenta uma única *extremidade redutora*, na qual o resíduo de glicose tem o carbono 1, redutor, livre e todas as outras são *extremidades não-redutoras*, com unidades de glicose com o carbono 1 estabelecendo ligações α-1,4 (Fig. 6.4 a). É a partir das extremidades não-redutoras que se dá o acréscimo (síntese) ou a retirada (degradação) de resíduos de glicose do polímero. Um esquema da molécula de glicogênio encontra-se na Fig. 6.4 b. O glicogênio é armazenado nas células animais como grânulos citossólicos, que constituem verdadeiras unidades funcionais dinâmicas: as enzimas necessárias ao seu metabolismo associam-se aos grânulos ou deles se dissociam, dependendo do conteúdo celular de carboidratos.

O amido é o carboidrato mais abundante da dieta dos seres humanos, seguido por sacarose e lactose. Conseqüentemente, o principal produto da digestão dos carboidratos é a glicose, secundada por pequenas quantidades de frutose e galactose. Carboidratos componentes de fibras dietéticas, como a celulose, por exemplo, não podem ser digeridos pelos seres humanos, que não dispõem de enzimas capazes de catalisar a hidrólise das ligações β-1,4 deste polissacarídio. Apesar disto, a presença de fibras na alimentação resulta em efeitos fisiológicos benéficos, a serem analisados no Capítulo 18.

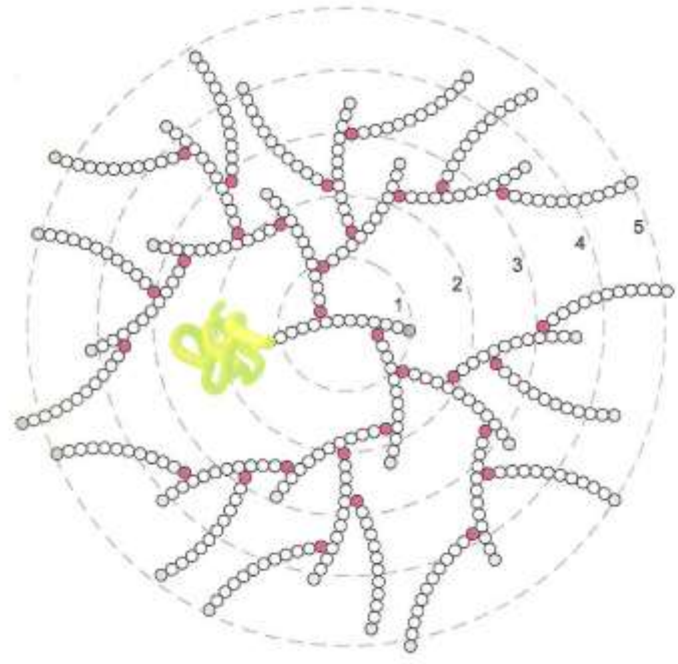
As funções dos carboidratos são bastante diversificadas, incluindo a sustentação (celulose, nos vegetais) e a reserva (glicogênio nos animais, amido nos vegetais), além de poderem estar ligados a lipídios e proteínas, formando os glicolipídios e as glicoproteínas, componentes de membranas (Seção 7.3).

6.2 ESTRUTURA DE LIPÍDIOS

Os lipídios (*lipos*, em grego, significa gordura) constituem uma classe de compostos com estrutura bastante variada, caracterizados por sua alta solubilidade em solventes orgânicos e por serem praticamente insolúveis em água. Exercem



(a)



(b)

Fig. 6.4 a) Representação de parte de uma cadeia de amilopectina ou de glicogênio. As unidades de glicose nas porções lineares são conectadas por ligações α-1,4; a ramificação é resultante de uma ligação α-1,6. Os resíduos de glicose das extremidades não-redutoras estão assinalados em cinza; aquele que inicia a ramificação, em vermelho, e o resíduo da única extremidade redutora, em azul. Este último resíduo está representado na forma aberta, para destacar o grupo aldeído do carbono 1. b) Modelo bidimensional da estrutura do glicogênio. A molécula é uma esfera, resultante do arranjo de cadeias ramificadas, basicamente, e lineares em 12 camadas concêntricas, das quais apenas 5 são mostradas; notar que somente as cadeias mais externas são lineares. As extremidades são diferenciadas palas mesmas cores da Fig. 6.4 a. A estrutura de cor verde simboliza a *glicogenina*, a proteína que inicia a síntese do glicogênio (ver Capítulo 13).

diversas funções biológicas, como componentes de membranas, isolantes térmicos e reservas de energia; eles próprios ou seus derivados têm também função de vitaminas e hormônios. Muitos lipídios são compostos *anfipáticos* (ou *anfifílicos*), ou seja, apresentam na molécula uma porção polar, hidrofílica, e uma porção apolar, hidrofóbica.

Segue-se uma descrição sucinta das categorias principais de lipídios. Os lipídios menos abundantes, porém não menos importantes, serão descritos juntamente com a via metabólica da qual participam.

6.2.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os *ácidos graxos* são ácidos monocarboxílicos, geralmente com uma cadeia carbônica longa, com número par de átomos de carbono e sem ramificações, podendo ser saturada ou conter uma insaturação (*ácidos graxos monoinsaturados*) ou duas ou mais insaturações (*ácidos graxos poliinsaturados*). O grupo carboxila constitui a região polar, e a cadeia carbônica, a parte apolar (Fig. 6.5). Ácidos graxos livres são pouco encontrados nos organismos; mais freqüentemente estão ligados a um álcool, que pode ser o glicerol ou a esfingosina. Os lipídios resultantes no primeiro caso são os triacilgliceróis e os glicerofosfolipídios; no segundo caso são os esfingolipídios (Fig. 6.6). Os triacilgliceróis são uma forma de armazenamento de ácidos graxos; os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios, juntamente com o colesterol, fazem parte das membranas celulares.

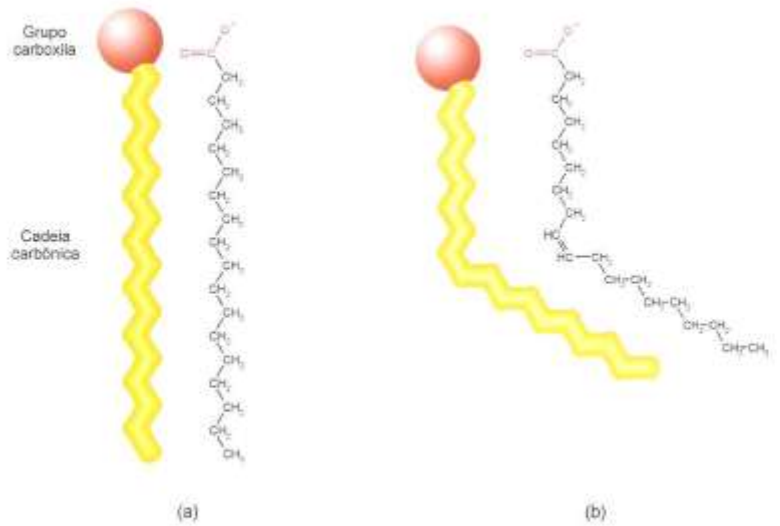


Fig. 6.5 Estrutura de dois ácidos graxos com 18 carbonos: ácido esteárico, saturado (a) e ácido oleico, insaturado (b). A presença da dupla ligação *cis* resulta em uma dobra na molécula. À esquerda das fórmulas estruturais, estão as suas representações tridimensionais.

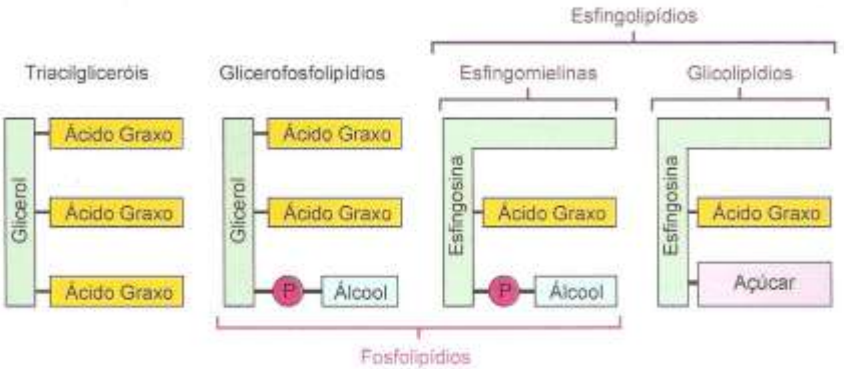


Fig. 6.6 Esquema geral dos principais lipídios que contêm ácidos graxos. P = grupo fosfato.

Os nomes triviais dos ácidos graxos, em geral, derivam-se das fontes onde são encontrados em abundância. Assim, ácido palmítico do óleo de palma (ou azeite de dendê), ácido oleico do óleo de oliva, linoleico e linolênico do óleo de linhaça etc. Os ácidos graxos mais comuns são os de 16 e 18 carbonos (Tabela 6.1). Os átomos de carbono podem ser indicados por números ou por letras. A numeração inicia-se no grupo carboxila (carbono 1 ou C_1) e aumenta em direção à extremidade oposta, formada pelo grupo metila. No sistema de denominação por letras, o carbono 2 é o carbono α, o carbono 3 é o carbono β e assim por diante, e o carbono do terminal CH_3 é o carbono ω (ômega, a última letra do alfabeto grego), também denominado carbono *n* (Fig. 6.7).

Tabela 6.1 Ácidos graxos naturais mais comuns

Saturados	Número de átomos de carbono				
Mirístico[1]	14				
Palmítico	16				
Esteárico	18				
Araquídico	20				
Lignocérico	24				
Insaturados		**Número de insaturações**	**Sistemas de abreviação**		
			Δ	ω	*n*
Palmitoleico	16	1	16:1 Δ9	16:1 ω-7	16:1 *n*-7
Oleico	18	1	18:1 Δ9	18:1 ω-9	18:1 *n*-9
Linoleico	18	2	18:2 Δ9,12	18:2 ω-6	18:2 *n*-6
α-Linolênico[2]	18	3	18:3 Δ9,12,15	18:3 ω-3	18:3 *n*-3
γ-Linolênico[2]	18	3	18:3 Δ6,9,12	18:3 ω-6	18:3 *n*-6
Araquidônico	20	4	18:4 Δ5,8,11,14	18:4 ω-6	18:4 *n*-6

[1]Os nomes triviais dos ácidos graxos são, tradicionalmente, indicados na forma ácida (não-ionizada); todavia, deve-se lembrar que a carboxila dos ácidos graxos (pK_a 4-5) permanece desprotonada no pH fisiológico.
[2]A denominação usualmente adotada para as duas espécies de ácido linolênico não obedece às regras de nomenclatura estabelecidas e segue um critério peculiar: quando a dupla ligação mais próxima da extremidade metila é do tipo ω-3, o ácido é o α-linolênico e quando é do tipo ω-6, o ácido é o γ-linolênico, porque a ligação ω-6 dista três carbonos ("contados" como α, β e γ) da dupla ligação ω-3.

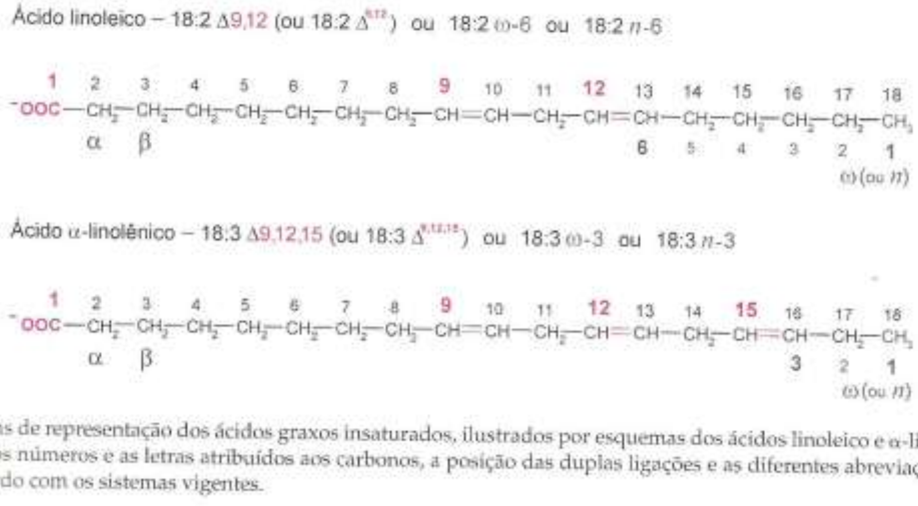


Fig. 6.7 Sistemas de representação dos ácidos graxos insaturados, ilustrados por esquemas dos ácidos linoleico e α-linolênico — estão indicados os números e as letras atribuídos aos carbonos, a posição das duplas ligações e as diferentes abreviações dos ácidos graxos, de acordo com os sistemas vigentes.

Para a identificação da posição das duplas ligações na cadeia carbônica, empregam-se diferentes sistemas de representação.

No sistema *delta* (Δ), adota-se a numeração convencional dos átomos de carbono, a partir da extremidade carboxila. Uma dupla ligação é representada pelo símbolo Δ, seguido pelo número do átomo de carbono mais próximo da carboxila (C_1) que participa da dupla ligação. Por exemplo, uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 é representada por Δ9 ou Δ^9.

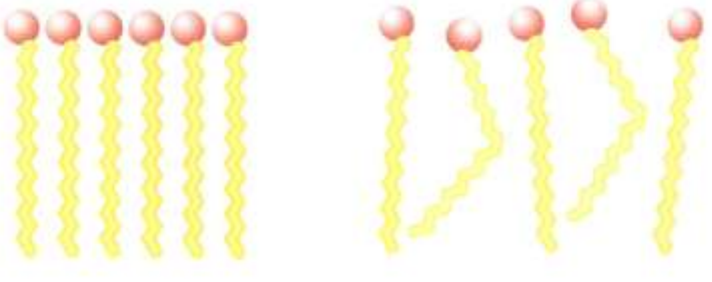
No sistema ω e no sistema *n*, a contagem dos átomos de carbono inicia-se no grupo CH_3, cujo carbono (carbono ω ou carbono *n*) passa a ser o de número 1, e a dupla ligação mais próxima da extremidade metila recebe um número igual ao número do átomo de carbono mais próximo do carbono ω (ou *n*) que forma a dupla ligação. Assim, ácidos graxos do tipo ω-3 (ou *n*-3) têm uma dupla ligação entre os carbonos 3 e 4, e aqueles do tipo ω-6 (ou *n*-6) têm uma dupla ligação entre os carbonos 6 e 7, numerando-se os carbonos sempre a partir do carbono ω (ou *n*) (Fig. 6.7). Os dois sistemas diferem unicamente pela letra (ω ou *n*) atribuída ao carbono do grupo CH_3.

O sistema Δ permite identificar a posição de *todas* as insaturações presentes no ácido graxo, especificando, sem ambigüidade, cada molécula; os sistemas ω e *n* revelam apenas a posição da dupla ligação mais próxima do grupo metila terminal.

Um ácido graxo costuma ser representado por uma abreviação que indica o número de átomos de carbono, seguido por dois-pontos, o número de duplas ligações e a posição das insaturações na cadeia de carbono, posição esta que pode ser mostrada segundo um dos sistemas descritos. Assim, o *ácido linoleico*, que tem 18 carbonos e duas insaturações, uma entre os carbonos 9 e 10 e a outra entre os carbonos 12 e 13, pode ser abreviado por:

18:2 Δ9,12 (ou 18:2 $\Delta^{9,12}$) ou 18:2 ω-6 ou 18:2 *n*-6

As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos lipídios deles derivados dependem da ocorrência ou não de insaturações na cadeia de hidrocarboneto e do seu comprimento. As cadeias dos ácidos graxos saturados são flexíveis e distendidas, podendo associar-se extensamente umas com as outras por meio de interações hidrofóbicas. Os ácidos graxos insaturados naturais têm, quase sempre, duplas ligações com configuração geométrica *cis*, ou seja, os átomos de hidrogênio dispõem-se do mesmo lado da dupla ligação (Fig. 6.5). A dupla ligação *cis* produz uma dobra rígida na cadeia, o que determina a formação de agregados menos compactos e, portanto, menos estáveis (Fig. 6.8). O comprimento da cadeia também interfere no grau de interação entre moléculas de ácidos graxos, que é tanto maior quanto mais longa for a cadeia. A intensidade de associação entre as moléculas de ácidos graxos reflete-se no valor do seu ponto de fusão, já que a passagem do estado sólido para o líquido envolve a ruptura parcial de interações intermoleculares. Em resumo, a temperatura de fusão dos ácidos graxos diminui com o número de insaturações e aumenta com o comprimento da cadeia. Assim, *ácido esteárico* (saturado) e *ácido oleico* (uma insaturação), ambos com 18 carbonos, têm pontos de fusão muito diferentes: 69,6°C e 13,4°C, respectivamente. Por outro lado, o ponto de fusão do ácido esteárico é maior do que o ponto de fusão do *ácido palmítico* (63,1°C), que tem 2 carbonos a menos. A consistência dos ácidos graxos (e seus derivados) à temperatura ambiente é uma conseqüência das suas propriedades: ácidos graxos saturados com mais de 14 carbonos são sólidos e, se possuírem pelo menos uma dupla ligação, são líquidos. O grau de fluidez das membranas biológicas depende, então, do tipo de ácido graxo presente nos seus lipídios estruturais.



(a) (b)

Fig. 6.8 Interação entre moléculas de ácidos graxos saturados (a) e entre saturados e insaturados (b). A presença de duplas ligações reduz o grau de interação entre moléculas vizinhas.

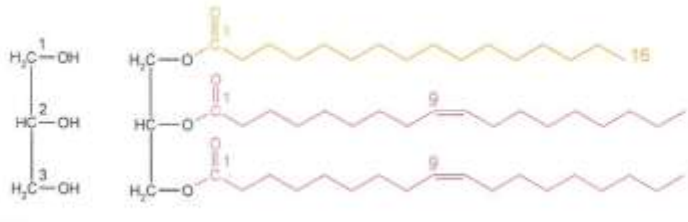
6.2.2 TRIACILGLICERÓIS

Os lipídios mais abundantes na natureza são os *triacilgliceróis* (também denominados *triglicerídios* ou *triglicérides*), constituídos por três moléculas de ácidos graxos esterificadas a uma molécula de glicerol, ou seja, apresentam três grupos *acila*[2] ligados a glicerol (Fig. 6.9). Compostos contendo um grupo acila (*monoacilgliceróis*) ou dois destes grupos (*diacilgliceróis*) e glicerol encontram-se em quantidades pequenas nas células, existindo como intermediários das vias de síntese e degradação de lipídios que contêm ácidos graxos e glicerol.

Os triacilgliceróis são compostos essencialmente apolares, pois as regiões polares de seus precursores (hidroxilas do glicerol e carboxilas dos ácidos graxos) desaparecem na formação das ligações éster. Assim, constituem moléculas muito hidrofóbicas, que podem ser armazenadas nas células de forma praticamente anidra.

As *gorduras animais* e os *óleos vegetais* são misturas de triacilgliceróis, que diferem na sua composição em ácidos graxos e, conseqüentemente, no seu ponto de fusão. Os triacilgliceróis das gorduras animais são ricos em ácidos graxos saturados, o que atribui a esses lipídios uma consistência sólida à temperatura ambiente; os de origem vegetal, ricos em ácidos graxos insaturados, são líquidos. Os óleos vegetais são utilizados para a fabricação de margarinas, através de um processo de hidrogenação, que reduz parte de suas duplas ligações e os torna sólidos à temperatura ambiente. O valor nutricional de lipídios de origem animal ou vegetal será discutido no Capítulo 18.

Os triacilgliceróis podem ser hidrolisados, liberando ácidos graxos e glicerol. Se esta hidrólise é feita em meio alcalino, formam-se sais de ácidos graxos, os sabões, e o processo é chamado saponificação. Este é o princípio da fabricação de sabões a partir de gordura animal fervida em presença de NaOH ou KOH. Atualmente, os sabões vêm sendo substituídos por detergentes sintéticos (geralmente alquil benzeno sulfonatos) para a solubilização de materiais insolúveis em água, tanto na esfera doméstica como na industrial. O detergente SDS (Seção 2.8) é largamente empregado em laboratórios de pesquisa, para a solubilização de lipídios e para o isolamento de proteínas.



Glicerol

Triacilglicerol
(1-palmitoil-2,3-dioleil-glicerol)

Fig. 6.9 Triacilgliceróis são moléculas essencialmente apolares, formadas pela esterificação de três ácidos graxos ao glicerol. Para maior clareza, foi omitida a forma angular das cadeias insaturadas.

6.2.3 GLICEROFOSFOLIPÍDIOS

Os *glicerofosfolipídios* são derivados do glicerol que contêm fosfato na sua estrutura. O glicerofosfolipídio mais simples é o *ácido fosfatídico* (*fosfatidato* no pH fisiológico), composto por uma molécula de glicerol esterificada a dois ácidos graxos nos carbonos 1 e 2, e a ácido fosfórico no carbono 3. O fosfatidato, além de ser encontrado como um componente menor de membranas celulares, atua como intermediário da síntese de triacilgliceróis e dos outros glicerofosfolipídios.

Os glicerofosfolipídios mais comuns originam-se da esterificação, ao ácido fosfórico do fosfatidato, de moléculas polares variáveis (representadas por X na Fig. 6.10). Os lipídios resultantes, portanto, diferem quanto aos substituintes do fosfatidato, dos quais derivam os seus nomes. Por exemplo, *colina* e *etanolamina* originam, respectivamente, *fosfatidilcolina* (também denominada *lecitina*) e *fosfatidiletanolamina* (ou *cefalina*); outros exemplos encontram-se na Fig. 6.10. Em alguns glicerofosfolipídios, o ácido fosfatídico está ligado a outro ácido fosfatídico através de uma molécula de glicerol; são chamados de *difosfatidilgliceróis* ou *cardiolipinas* (Fig. 6.10), por terem sido descobertos em músculo cardíaco. Os membros de cada uma dessas categorias de glicerofosfolipídios diferem entre si pelo tipo de ácido graxo que ocupa as posições 1 e 2. Geralmente, a posição 1 é ocupada por um ácido graxo saturado, e a posição 2, por um insaturado.

A molécula dos glicerofosfolipídios contém uma região polar, composta pelo grupo fosfato e seus substituintes, e uma parte apolar, devida aos ácidos graxos e glicerol. Por conterem fosfato, os glicerofosfolipídios e as esfingomielinas (descritas na seção seguinte) são denominados ***fosfolipídios*** (Fig. 6.6).

[2] *Acila* é a designação genérica para grupos derivados de ácidos graxos, por retirada do grupo OH; acetila, propionila e palmitoila, por exemplo, são as designações para os grupos derivados de ácido acético, propiônico e palmítico, respectivamente.

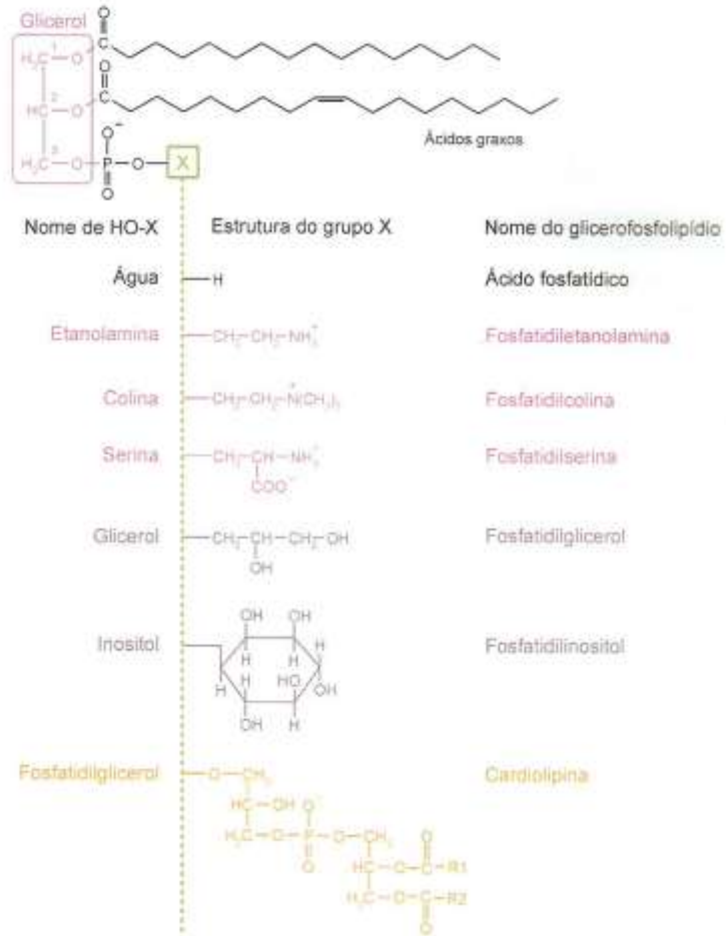


Fig. 6.10 Glicerofosfolipídios. A porção hidrofílica de sua molécula consta do grupo fosfato ligado a um grupo polar, variável, representado por X; as cadeias carbônicas dos ácidos graxos esterificados ao glicerol constituem a porção hidrofóbica.

6.2.4 ESFINGOLIPÍDIOS

A estrutura geral dos *esfingolipídios* (Fig. 6.11) assemelha-se à dos glicerofosfolipídios. Todavia, os esfingolipídios não contêm glicerol e seu esqueleto básico é formado por um aminoálcool contendo uma longa cadeia de hidrocarboneto, que, mais freqüentemente, é a *esfingosina*. O grupo amino da esfingosina liga-se a um ácido graxo por uma ligação amídica, originando *ceramida*. A ligação de uma estrutura polar ao carbono 1 da ceramida forma os esfingolipídios, que, de acordo com a natureza da estrutura polar, podem ser classificados em três tipos: esfingomielinas, cerebrosídios e gangliosídios (Fig. 6.11).

Nas *esfingomielinas*, descobertas na bainha de mielina que envolve os axônios de células nervosas, a porção polar é uma *fosforilcolina*. A presença do grupo fosfato nas esfingomielinas permite classificá-las, juntamente com os glicerofosfolipídios, como ***fosfolipídios*** (Fig. 6.6), que são os lipídios mais abundantes das membranas biológicas.

Nos *cerebrosídios*, a ceramida liga-se a um açúcar, que pode ser glicose ou galactose. Os *gangliosídios* são ainda mais complexos, por apresentarem uma região polar composta por oligossacarídios, às vezes ramificados, com a inclusão de açúcares aminados nas extremidades. Os cerebrosídios e os gangliosídios são encontrados predominantemente no cérebro, ocorrendo em quantidades menores nos outros tecidos. São referidos, conjuntamente, como ***glicolipídios*** (Fig. 6.6).

A região apolar da molécula dos esfingolipídios é formada pelas cadeias carbônicas da esfingosina e do ácido graxo a ela ligado.

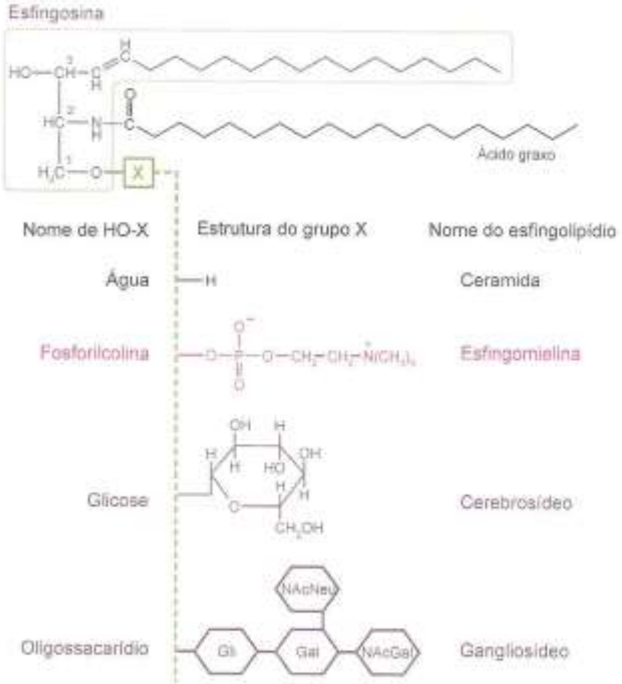


Fig. 6.11 Esfingolipídios. Os membros desta classe de lipídios diferem quanto ao grupo polar (simbolizado por X) ligado à ceramida; a porção apolar da molécula dos esfingolipídios é formada pelas cadeias carbônicas da esfingosina e do ácido graxo, os componentes da ceramida. Os monossacarídios componentes da cadeia de oligossacarídios dos gangliosídios são: glicose (Gli), galactose (Gal), N-acetil-galactosamina (NAcGal) e ácido N-acetilneuramínico ou ácido siálico (NAcNeu).

6.2.5 ESTERÓIDES

Os *esteróides* são lipídios que apresentam um núcleo tetracíclico característico em sua estrutura. O composto-chave deste grupo é o *colesterol* (Fig. 6.12), não apenas por ser o esteróide mais abundante dos tecidos animais, como por servir de precursor à síntese de todos os outros esteróides, que incluem *hormônios esteróides* (hormônios sexuais e do córtex das glândulas supra-renais), *sais biliares* e *vitamina D*. O colesterol tem, ainda, uma função estrutural importante nas membranas de células animais. Sua molécula exibe um caráter fracamente anfipático, porque o grupo hidroxila é polar e o restante da molécula — os anéis esteroídicos e a cadeia lateral alifática — é apolar. Como o sistema de anéis compõe um plano rígido, o colesterol influencia a fluidez das membranas celulares.

O colesterol, no organismo humano, é transportado pelas lipoproteínas plasmáticas, geralmente ligado a ácidos graxos insaturados como o ácido linoleico, formando *ésteres de colesterol* — a ligação éster forma-se entre o grupo hidroxila do colesterol e a carboxila do ácido graxo; esta também é a forma de armazenamento de colesterol dentro das células. Apesar de desempenhar funções absolutamente essenciais, o colesterol é muito conhecido por sua associação com a *aterosclerose* (Seção 20.8).

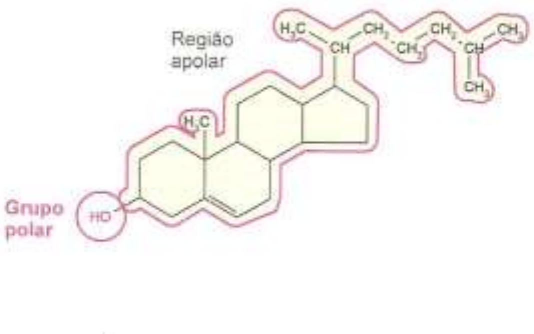


Fig. 6.12 Estrutura do colesterol. O grupo hidroxila — parte polar da molécula — pode ligar-se a um ácido graxo, formando um éster de colesterol, uma molécula mais apolar que o colesterol.

Nos vegetais, o teor de colesterol é, em média, 100 vezes menor do que nos animais — em óleos vegetais é tão baixo que, para fins dietéticos, é considerado igual a zero. As plantas contêm quantidades consideráveis de outros esteróides, os *fitoesteróides*, que diferem do colesterol apenas quanto aos substituintes da cadeia lateral.

6.2.6 FUNÇÕES DOS LIPÍDIOS MAIS COMUNS

Os triacilgliceróis são reservas de energia

Os triacilgliceróis constituem a maneira mais eficiente de armazenar energia nos seres vivos. O seu caráter fortemente hidrofóbico permite o armazenamento sob forma praticamente anidra, ou seja, sem moléculas de água adsorvidas, as quais aumentariam muito o peso da reserva de energia. Além disso, como são compostos altamente reduzidos, sua oxidação libera muito mais energia que a oxidação de quantidades equivalentes de carboidratos ou proteínas. Nos vertebrados, os triacilgliceróis são depositados no tecido adiposo, de localização visceral e subcutânea, que atua também como isolante térmico e como proteção contra traumas mecânicos.

Os lipídios anfipáticos são componentes estruturais de membranas

Ao contrário dos triacilgliceróis, todos os outros lipídios descritos são moléculas anfipáticas. Nos fosfolipídios — glicerofosfolipídios e esfingomielinas — a porção hidrofílica é constituída pelo grupo fosfato, que apresenta carga negativa em pH fisiológico, ligado a uma outra molécula, também polar, que pode ter carga positiva (colina e etanolamina), carga positiva e negativa (serina) ou não apresentar carga (inositol) (Figs. 6.10 e 6.11). Os glicolipídios — cerebrosídios e gangliosídios — contêm açúcares hidrofílicos, que podem não apresentar carga (glicose e galactose) ou apresentar carga positiva devido à presença de grupos amino (Fig. 6.11). A porção hidrofílica do colesterol é representada por uma hidroxila, e o restante da molécula é apolar (Fig. 6.12). A região hidrofóbica dos demais lipídios anfifílicos mencionados é representada pelas cadeias de hidrocarboneto da esfingosina e/ou dos ácidos graxos.

Os lipídios anfipáticos são elementos estruturais importantes das membranas biológicas. A distribuição desses lipídios nos diferentes tipos de membranas celulares será analisada no próximo capítulo.

6.2.7 TRANSPORTE DE LIPÍDIOS: LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Os lipídios, insolúveis em meio aquoso, são transportados pelo sistema circulatório dos organismos pluricelulares em agregados moleculares hidrossolúveis. Nos seres humanos, os lipídios apolares associam-se a lipídios anfipáticos e proteínas, formando as *lipoproteínas plasmáticas*. Já os ácidos graxos são mobilizados ligados à albumina sérica; apenas uma fração pequena de ácidos graxos é transportada pelas lipoproteínas plasmáticas na forma de ésteres de colesterol. A associação a moléculas polares viabiliza a distribuição aos tecidos dos lipídios provenientes da dieta (absorvidos no intestino) e daqueles sintetizados endogenamente (sobretudo no fígado).

As lipoproteínas plasmáticas (Fig. 6.13) são partículas esféricas com um núcleo central de lipídios apolares — ésteres de colesterol e triacilgliceróis — circundado por uma monocamada de lipídios anfipáticos — fosfolipídios e colesterol — à qual estão associadas moléculas de proteína. Estas proteínas são denominadas conjuntamente de *apolipoproteínas*[5] e classificadas em A, B, C etc.; além de contribuírem para a "solubilização" de lipídios no plasma, constituem sítios de reconhecimento que permitem a ligação das lipoproteínas a receptores da superfície celular de tecidos específicos.

As lipoproteínas plasmáticas são classificadas segundo a sua densidade, que é tanto menor quanto maior for o seu teor de lipídios (Tabela 6.2). A composição dessas partículas sofre modificações contínuas, devido à troca de moléculas de lipídios e de apolipoproteínas, por meio de processos ainda não totalmente elucidados. Segue-se um resumo das funções das principais classes de lipoproteínas.

Os *quilomícrons* são sintetizados na mucosa intestinal a partir dos lipídios da dieta, que, desta forma, são transportados aos tecidos; são especialmente ricos em triacilgliceróis.

As *VLDL* (***V**ery **L**ow **D**ensity **L**ipoproteins*) têm origem hepática e transportam triacilgliceróis e colesterol para os outros tecidos; originam as *IDL* (***I**ntermediate **D**ensity **L**ipoproteins*) e as *LDL* (***L**ow **D**ensity **L**ipoproteins*), ricas em colesterol, predominantemente na forma de ésteres de colesterol. As LDL são a principal fonte de colesterol para os tecidos, exceto fígado e intestinos; elas penetram nas células através de endocitose (Seção 7.4.2).

As *HDL* (***H**igh **D**ensity **L**ipoproteins*) têm função oposta à das LDL, atuando na remoção de colesterol dos tecidos para o fígado.

A atuação das lipoproteínas no transporte de lipídios em condições normais e patológicas será abordada, ainda, nos Capítulos 18 e 20.

---

[5] O termo *apolipoproteínas* origina-se do grego *apó*, que significa separação, e designa a proteína na sua forma livre, não associada a lipídios.

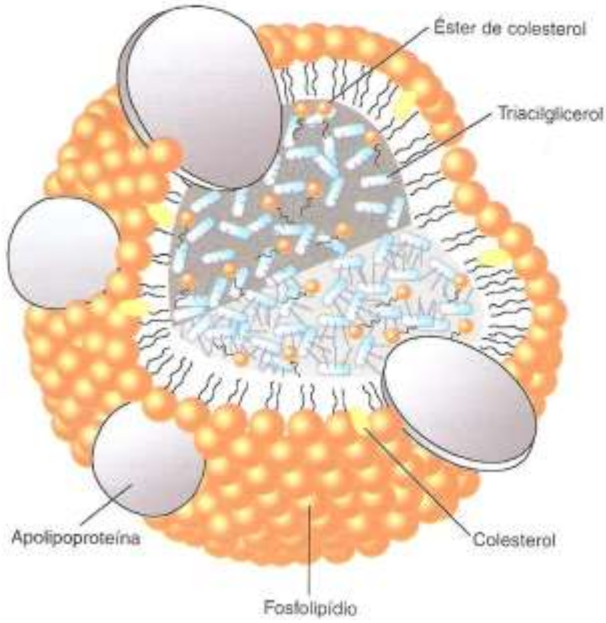


Fig. 6.13 Esquema geral das lipoproteínas plasmáticas. O modelo aplica-se a todas as classes de lipoproteínas, lembrando que elas diferem quanto à proporção entre os lipídios transportados (Tabela 6.2) e quanto ao tipo de apolipoproteína associada à monocamada periférica. Reproduzida de Ritter, P: Biochemistry – A Foundation, 1st edition. Brooks/Cole, 1996.

Tabela 6.2 Composição das principais lipoproteínas do plasma humano

Lipoproteína	Densidade ($g \cdot cm^{-3}$)	Total de proteínas (%)	Total de lipídios (%)	% dos lipídios totais			
				Fosfolipídios	Colesterol	Triacilgliceróis	Ésteres de colesterol
Quilomícrons	0,90	2	98	8	2	87	4
VLDL	0,98	8	93	18	8	58	13
IDL	1,01	17	83	24	9	30	28
LDL	1,04	22	78	22	9	10	42
HDL	1,14	48	53	33	7	8	21

A composição das diferentes classes de lipoproteínas é variável, porque sofrem alterações metabólicas contínuas; os valores apresentados são a média entre os valores máximos e mínimos verificados em indivíduos normais. O diâmetro destas partículas decresce a partir de 10^3 nm, nos quilomícrons, até 10 nm, nas HDL. As apolipoproteínas constituintes das diferentes lipoproteínas foram omitidas.

BIBLIOGRAFIA

Behrman EJ, Gopalan V: Cholesterol and plants. *J Chem Educ* **82** (12): 1791-1793, 2005.

Curi R et al: *Entendendo a Gordura – Os Ácidos Graxos*. Editora Manole Ltda., 2002.

Holmberg N et al: Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed. *Plant Physiol* **130**: 303-311, 2002.

Meléndez-Hevia E et al: *Glycogen Structure: an Evolutionary View in Technological and Medical Implications of Metabolic Control Analysis*, p. 319-326. Cornish-Bowden A, Cárdenas ML, editors. Kluwer Academic Publishers, 2000.

Solomons TWG, Fryle CB: *Organic Chemistry*, 8th ed. Wiley, 2003.

7

Membranas

As células, além de serem envolvidas pela membrana plasmática, apresentam sistemas internos de membranas que delimitam organelas subcelulares, como o núcleo, a mitocôndria, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e vários tipos de vacúolos, incluindo os lisossomos. Organelas estão presentes nas células eucarióticas, constituintes dos animais, vegetais, protozoários, fungos e da maioria das algas; não são encontradas nas células procarióticas, como as bactérias.

A membrana plasmática é o elemento mediador da comunicação entre a célula e o seu meio externo. Constitui uma barreira altamente seletiva, que determina a criação de um compartimento interno com composição química própria, diferente do meio externo. Além disso, possibilita a captação de sinais extracelulares (hormônios, por exemplo), participando dos processos de reconhecimento e comunicação entre as células. Sua flexibilidade possibilita mudanças na forma da célula e, em alguns casos, sua locomoção.

A coordenação das reações metabólicas das células eucarióticas depende, em grande parte, da compartimentalização estabelecida pelas membranas intracelulares: isolamento de vias metabólicas, alterações localizadas de pH e da concentração de metabólitos etc. Constituem, ainda, um suporte para a disposição organizada de sistemas enzimáticos, aumentando muito a eficiência da catálise.

As membranas biológicas, apesar de desempenharem funções tão diversificadas, exibem características estruturais comuns.

7.1 INTERAÇÕES ENTRE LIPÍDIOS ANFIPÁTICOS: A BICAMADA LIPÍDICA

Os lipídios anfipáticos, quando são adicionados a um meio aquoso, tendem a agregar-se, organizando-se espontaneamente em estruturas plurimoleculares. Estas estruturas permitem maximizar as interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas, isolando-as da água, e deixar os grupos polares em contato com o solvente, com o qual podem interagir. Tais arranjos moleculares constituem o estado de menor energia livre para esses lipídios em água e resultam da presença de duas regiões com solubilidade diferente na mesma molécula. O tipo de estrutura formada é determinado pela geometria da molécula do lipídio anfipático (Fig. 7.1).

Lipídios com uma única cadeia carbônica, como sabões e detergentes, devido à forma cônica e afilada de suas moléculas, constituem, preferencialmente, *micelas*. Nesta estrutura esférica, as cadeias de hidrocarboneto organizam-se no interior, isolando-se da água, e os grupos polares posicionam-se na superfície externa, interagindo com o solvente (Fig. 7.1a). A formação de micelas é uma etapa importante na digestão dos lipídios da dieta.

A maioria dos fosfolipídios e glicolipídios associam-se em uma camada dupla de moléculas, chamada *bicamada lipídica*. Esta estrutura permite uma agregação mais estável das moléculas desses lipídios, que têm forma cilíndrica devido à presença de duas cadeias apolares. As moléculas de lipídios alinham-se lado a lado, compondo duas monocamadas; as cadeias carbônicas das monocamadas agrupam-se frente a frente, de modo a criar um domínio hidrofóbico no meio

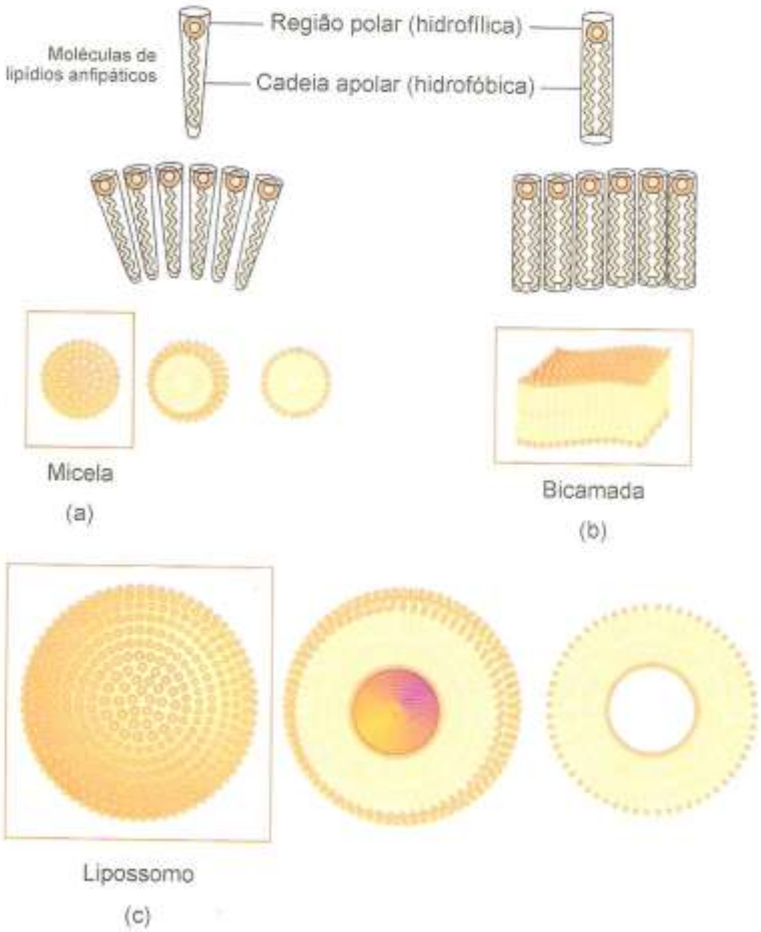


Fig. 7.1 Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso. a) Micelas são formadas por moléculas de lipídios com uma única cadeia carbônica, cadeias estas que se localizam no interior dessas estruturas. b) A bicamada lipídica é uma estrutura bidimensional na qual as cadeias carbônicas formam um domínio central hidrofóbico, isolando-se da água, exceto nas extremidades da bicamada; é a estrutura comumente formada por lipídios anfipáticos com duas cadeias de hidrocarboneto. c) Lipossomo é uma vesícula oca, resultante do fechamento de uma bicamada lipídica, dotada de uma cavidade central preenchida por solvente.

da bicamada; os grupos hidrofílicos dispõem-se na superfície das duas faces da bicamada, interagindo com a água (Fig. 7.1b). O colesterol pode intercalar-se entre os lipídios anfipáticos que constituem as bicamadas lipídicas.

Bicamadas lipídicas tendem a se converter em estruturas fechadas, chamadas *lipossomos*, que são mais estáveis porque não apresentam caudas hidrofóbicas expostas ao solvente, como acontece na periferia das bicamadas planas. Lipossomos são, portanto, vesículas esféricas sintéticas formadas por uma bicamada lipídica contínua, que delimita uma cavidade interna preenchida por solvente (Fig. 7.1c). Eles podem ser produzidos com moléculas de um único tipo ou de diferentes tipos de lipídios anfipáticos. Os lipossomos têm sido largamente empregados como modelos para o estudo de bicamadas lipídicas e membranas.

A maioria dos compostos polares não atravessam a bicamada lipídica

Experiências com lipossomos demonstram que a bicamada lipídica permite a livre difusão de moléculas apolares, mas é essencialmente impermeável a compostos iônicos ou polares, insolúveis no centro hidrofóbico da bicamada. A água é uma exceção, podendo atravessar a bicamada lipídica com relativa facilidade.

A bicamada lipídica, portanto, isola o líquido contido no interior do lipossomo do líquido externo. Apesar disto, os mais diversos compostos, desde que estejam presentes no meio utilizado para a formação das vesículas, podem ser englobados no seu compartimento interno. Graças a esta propriedade, os lipossomos têm sido testados como uma via alternativa para a administração de medicamentos. Estas substâncias são encapsuladas em lipossomos, que são transportados pela circulação até os tecidos; por fusão das vesículas com a membrana plasmática, os fármacos são introduzidos diretamente nas células. Um maior conhecimento das peculiaridades de membranas de tecidos diferentes permitirá preparar lipossomos específicos para o tecido-alvo pretendido. Desta forma, a atuação inespecífica de muitos agentes farmacológicos poderá ser evitada, reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis.

A consistência da bicamada lipídica depende da temperatura e de sua composição

As bicamadas lipídicas sofrem mudança de estado físico em uma temperatura característica, chamada *temperatura de transição*, análoga ao ponto de fusão dos ácidos graxos. Essa mudança de fase é devida à alteração do grau de interação das cadeias de hidrocarboneto constituintes da bicamada. Abaixo da temperatura de transição, as cadeias são mais ordenadas e interagem fortemente, e a bicamada tem uma consistência sólida; acima dessa temperatura, elas são mais desordenadas e menos compactadas, o que determina um estado líquido.

A temperatura de transição de bicamadas é grandemente influenciada pela natureza dos lipídios anfipáticos que a compõem: é tanto maior quanto maior for o teor de ácidos graxos com cadeias longas e saturadas, o inverso acontecendo em relação a ácidos graxos com cadeias curtas e insaturadas (Seção 6.2.1).

7.2 ESTRUTURA DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As membranas biológicas são formadas por uma bicamada lipídica entremeada de proteínas

A bicamada lipídica é a estrutura básica comum a todas as membranas biológicas e, como nos lipossomos, serve como uma barreira impermeável à maioria dos íons e moléculas hidrossolúveis. Nas células, está associada a proteínas, que viabilizam o transporte de determinados solutos; ou seja, as membranas são permeáveis a compostos para os quais dispõem de proteínas que atuem como transportadores específicos. As proteínas desempenham inúmeras outras funções características de cada membrana.

A composição de lipídios e proteínas varia conforme a membrana considerada. O conteúdo de lipídios das membranas de mamíferos depende do estado nutricional e da idade do animal; nas plantas, bactérias e animais ectotérmicos, varia com determinadas condições do meio ambiente, como luz e temperatura. Os glicolipídios e as glicoproteínas respondem pelo teor de carboidratos das membranas, que é, geralmente, baixo.

Os fosfolipídios são os componentes mais abundantes das membranas

A comparação entre os lipídios anfipáticos que compõem a bicamada das membranas dos seres vivos (Tabela 7.1) permite algumas generalizações.

Nos organismos superiores, as membranas celulares são construídas, basicamente, com fosfolipídios, ou seja, glicerofosfolipídios e esfingomielinas. Os glicerofosfolipídios estão presentes em quantidades muito maiores que as esfingomielinas, sendo fosfatidilcolina o lipídio mais abundante. Além dos fosfolipídios, o colesterol é um componente importante das membranas eucarióticas; nas membranas plasmáticas é a molécula de lipídio presente na maior concentração, sendo encontrado em pequenas quantidades nas membranas intracelulares. As membranas mitocondriais, especialmente as internas, distinguem-se das demais e assemelham-se à membrana plasmática das bactérias, por apresentarem difosfatidilglicerol (cardiolipina). A bainha de mielina, que deu o nome às esfingomielinas, é, na realidade, muito rica em glicolipídios e colesterol. Os glicolipídios também ocorrem na face externa das membranas plasmáticas.

As membranas de bactérias caracterizam-se pela presença de alguns poucos tipos de glicerofosfolipídios, predominando fosfatidiletanolamina; colesterol e esfingolipídios (esfingomielinas e glicolipídios) são virtualmente ausentes.

As membranas biológicas são fluidas

A consistência das membranas celulares, como acontece com as bicamadas lipídicas sintéticas, varia com o comprimento e o grau de insaturação das cadeias carbônicas dos seus lipídios estruturais e, também, com a temperatura.

Tabela 7.1 Composição em lipídios de diferentes membranas celulares

Membrana	% dos lipídios totais									
	F	FC	FE	FS	FI	FG	DFG	EM	GL	C
Plasmática[1]	1,0	18	11	9,0	4,0	—	—	14	7	30
Mitocondrial interna[1]	0,7	45	25	1,0	6,0	2,0	18	2,5	—	3,0
Mitocondrial externa[1]	1,3	50	23	2,0	13	2,5	3,5	5,0	—	5,0
Nuclear[1]	1,0	55	20	3,0	7,0	—	—	3,0	—	10
Golgi[1]	—	40	15	3,5	6,0	—	—	10	—	7,5
Bainha de mielina[2]	—	11	14	7,0	—	—	—	6,0	21	22
Escherichia coli[3]	—	—	80	—	—	15	5,0	—	—	—
Bacillus megaterium[3]	—	—	69	—	—	30	1,0	—	—	—

F = fosfatidato; FC = fosfatidilcolina; FE = fosfatidiletanolamina; FS = fosfatidilserina; FI = fosfatidilinositol; FG = fosfatidilglicerol; DFG = difosfatidilglicerol (cardiolipina); EM = esfingomielina; GL = glicolipídios (cerebrosídios e gangliosídios); C = colesterol.
[1]Membranas de hepatócitos de rato; [2]Cérebro de rato; [3]Membrana plasmática.

Seres vivos cuja temperatura flutua com a do meio ambiente — como plantas, bactérias e animais ectotérmicos — modificam a composição em ácidos graxos de suas membranas em resposta a alterações da temperatura ambiente, de modo que a sua fluidez seja sempre constante. A temperatura corpórea dos animais endotérmicos é sempre maior que a temperatura de transição de suas membranas, ou seja, as membranas dos mamíferos são líquidas a 37°C. Em resumo, as membranas dos seres vivos, em condições fisiológicas, são invariavelmente fluidas, com consistência semelhante à da parafina líquida.

O colesterol, nos eucariotos, constitui um fator adicional de regulação da fluidez das membranas, devido a dois efeitos diversos. Suas moléculas intercalam-se na bicamada lipídica, a hidroxila interagindo com os grupos polares dos fosfolipídios e os anéis esteroídicos, com as cadeias carbônicas. Como a molécula de colesterol não alcança o centro da bicamada, a interação com as cadeias de hidrocarboneto e a sua imobilização parcial dá-se apenas na região mais próxima dos grupos polares. O resultado é um aumento de rigidez na porção periférica da membrana. Por outro lado, quando está presente em concentrações relativamente altas, como acontece nas membranas plasmáticas, o colesterol impede que as cadeias carbônicas interajam fortemente — o que resultaria em um estado gelatinoso — e contribui, assim, para que as membranas sejam mais líquidas.

Diversas condições patológicas parecem estar relacionadas com alterações da consistência de membranas. No alcoolismo crônico, há um aumento do teor de colesterol da membrana plasmática das hemácias, levando a um aumento da fluidez da membrana. Estas células adquirem uma forma anormal, o que dificulta a sua passagem por capilares menores e ocasiona a sua destruição pelo baço prematuramente, resultando em um estado anêmico. Além disso, o álcool e determinados agentes farmacológicos, como os anestésicos, parecem atuar diretamente nas membranas do sistema nervoso central, alterando o seu estado físico.

As duas monocamadas de uma membrana contêm lipídios diferentes

A estrutura líquida das membranas naturais permite que as moléculas de lipídios possam mover-se lateralmente, dentro da monocamada da qual fazem parte. Esta difusão é tão rápida que uma molécula de lipídio poderia dar a volta ao redor de uma bactéria (perímetro de 1 a 2 μm) em cerca de 1 segundo. Por outro lado, a migração de lipídios de uma monocamada para a outra é extremamente rara, porque exige que a porção polar da molécula deixe de interagir favoravelmente com a água e atravesse o centro hidrofóbico da bicamada, um processo muito endergônico. O resultado desta impossibilidade é uma distribuição assimétrica de lipídios, ou seja, as duas monocamadas são constituídas por lipídios diferentes. A assimetria é gerada durante a síntese da membrana. As membranas plasmáticas de células animais são especialmente assimétricas: os glicolipídios, por exemplo, localizam-se apenas na monocamada externa.

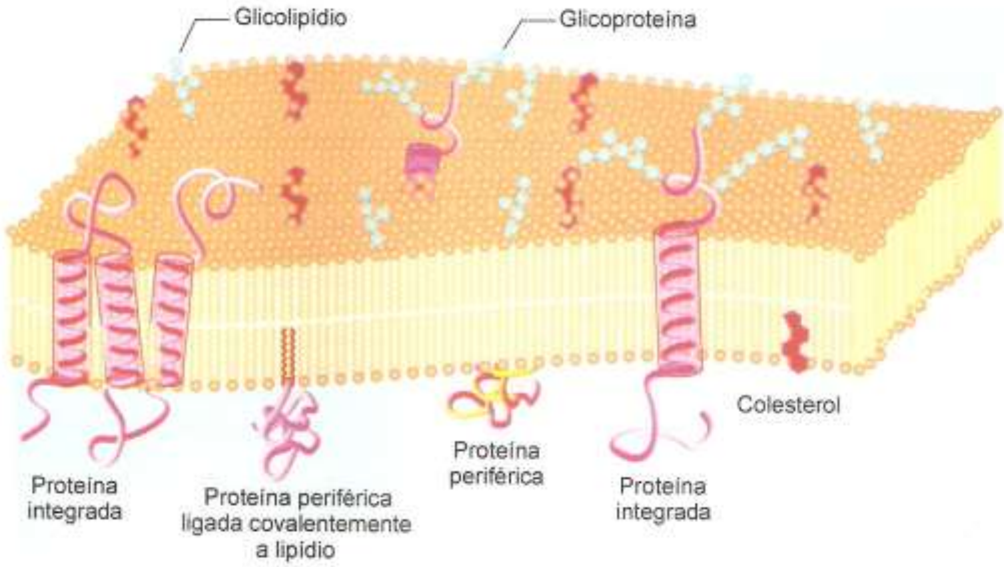
O grau de interação de proteínas com a bicamada lipídica é variável

Enquanto os lipídios presentes nas membranas biológicas são os principais responsáveis pela sua estrutura e fluidez, as proteínas são responsáveis pelas funções específicas associadas a cada tipo de membrana. Sua proporção em

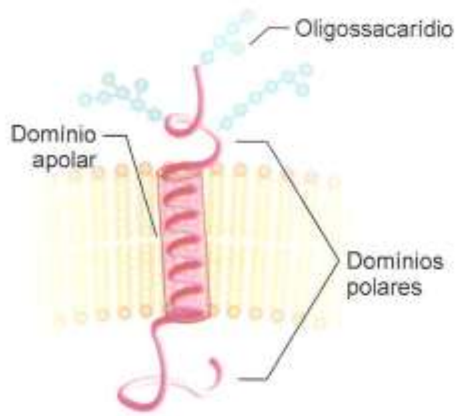
relação aos lipídios varia, sendo excepcionalmente grande em membranas com alto conteúdo de enzimas e permeases, como a membrana interna da mitocôndria.

As proteínas dispõem-se na bicamada lipídica de acordo com o modelo do *mosaico fluido* (Fig. 7.2a), proposto por Singer e Nicholson, no qual os componentes interagem por meio de ligações não-covalentes e podem difundir-se lateralmente em um meio de consistência líquida.

Muitas proteínas de membrana estão imersas na bicamada lipídica, associando-se fortemente com as cadeias apolares dos lipídios, através de interações hidrofóbicas. Estas proteínas, chamadas *integradas*, são extraídas somente após



(a)



(b)

Fig. 7.2 (a) Esquema de um fragmento de uma membrana plasmática hipotética em um determinado instante. Os oligossacarídios de glicoproteínas e glicolipídios projetam-se para o exterior da célula. A proporção entre o tamanho das moléculas não é a verdadeira. Para simplificar o esquema, todas as cadeias carbônicas dos fosfolipídios foram representadas como saturadas. (b) Detalhamento de uma glicoproteína integral.

ruptura da membrana, por exemplo, com tratamento com detergentes ou solventes orgânicos; ainda assim, são obtidas com moléculas de lipídios aderidas e são insolúveis em água.

A maioria das proteínas integradas estendem-se transversalmente através da membrana graças à presença de três domínios em sua estrutura: dois domínios hidrofílicos terminais, ricos em aminoácidos polares, e um domínio hidrofóbico central, com predominância de aminoácidos apolares (Fig. 7.2b). O domínio central interage com o interior hidrofóbico da bicamada e os outros dois ficam expostos, interagindo com a água nos dois lados da membrana. O domínio que atravessa a membrana tem, freqüentemente, estrutura em α-hélice. Outras proteínas integradas, além do domínio hidrofóbico, têm apenas um domínio hidrofílico exposto em uma das superfícies da membrana. As proteínas transportadoras de elétrons da membrana interna da mitocôndria — com exceção do *citocromo c* — são exemplos de proteínas integradas.

Uma segunda classe de proteínas, denominadas *periféricas*, liga-se à superfície da membrana por pontes de hidrogênio ou interações iônicas, estabelecidas com grupamentos polares dos lipídios da bicamada. Estas ligações podem ser rompidas por procedimentos que não perturbam significativamente a estrutura da membrana, como o tratamento com uréia ou soluções salinas de alta concentração. Após extração, as proteínas periféricas são solúveis em água e o exemplo clássico é o citocromo *c*. Algumas proteínas periféricas associam-se, ainda, a regiões de proteínas integradas expostas em uma das faces da membrana; outras ligam-se a determinadas moléculas de lipídios da bicamada, que atuam como verdadeiras âncoras.

A extensão da cadeia polipeptídica que fica incluída na bicamada ou projetada para fora está intimamente relacionada com a função da proteína. Assim, proteínas que atuam como receptores de moléculas extracelulares ou antígenos de superfície têm uma porção externa muito maior que o segmento intramembrana. Em outros casos, a cadeia polipeptídica pode atravessar várias vezes a bicamada lipídica, formando α-hélices hidrofóbicas que se organizam delimitando um canal. Este é o tipo de organização de determinadas permeases, responsáveis pelo transporte de metabólitos através de membranas.

Qualquer que seja o grau de associação com a matriz lipídica, as proteínas de membrana podem difundir-se apenas lateralmente, não passando de uma monocamada para a outra; ou seja, a membrana apresenta uma distribuição assimétrica de proteínas, como acontece com os fosfolipídios. As glicoproteínas são um exemplo de proteínas com localização restrita a uma face da membrana. A movimentação lateral de proteínas, em algumas circunstâncias, pode ser restringida. Nas células de eucariotos, por exemplo, o citoplasma contém um citoesqueleto — formado por microfilamentos, semelhantes aos filamentos de actina das fibras musculares — e microtúbulos que interagem com a membrana plasmática, reduzindo a mobilidade de proteínas integradas.

As membranas biológicas, graças à sua fluidez, podem fundir-se umas com as outras em diversos processos importantes, como a divisão celular, a fusão do espermatozóide com o óvulo e a formação de vesículas de exocitose ou de endocitose.

7.3 GLICOPROTEÍNAS E GLICOLIPÍDIOS DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Os carboidratos presentes nas membranas de células eucarióticas ocorrem como cadeias de oligossacarídios ligados covalentemente a proteínas — *glicoproteínas* — e a lipídios — *glicolipídios*. Estas cadeias são muito hidrofílicas e projetam-se para o lado externo da membrana plasmática ou para o interior de organelas como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Sua estrutura é muito variada, podendo conter dezenas de resíduos de açúcares, organizados em cadeias ramificadas. A grande diversidade de configuração dos oligossacarídios justifica sua atuação como marcadores característicos de cada tipo de célula. São os mediadores da comunicação entre as células, sendo reconhecidos por proteínas que se ligam especificamente a carboidratos em inúmeros processos importantes, resumidos a seguir.

O óvulo de mamíferos contém uma glicoproteína de superfície cuja porção carboidrato é reconhecida apenas por espermatozóides da mesma espécie.

O reconhecimento entre células ocorre, ainda, durante o crescimento e a diferenciação dos tecidos (morfogênese). Alterações nos marcadores de superfície provocam distúrbios na adesão das células, podendo estar relacionados com a formação de tumores e a malignização no câncer.

Os determinantes antigênicos, responsáveis pelo reconhecimento de células pelo sistema imunitário, são carboidratos complexos de glicoproteínas e glicolipídios da membrana plasmática. Este é o caso do sistema ABO dos grupos sanguíneos e dos determinantes responsáveis pela rejeição de órgãos e tecidos transplantados.

Processos patológicos também envolvem o reconhecimento de oligossacarídios sinalizadores: proteínas de agentes infecciosos, como vírus e bactérias, ligam-se a carboidratos de glicoproteínas ou glicolipídios específicos da superfície das células hospedeiras. Exemplos bem conhecidos desses processos são a ligação do vírus da gripe e da toxina da cólera às células humanas.

Os receptores de hormônios também são glicoproteínas da membrana plasmática.

A "idade" das proteínas plasmáticas é indicada pela ausência de determinados açúcares na sua porção carboidrato. Proteínas contendo esta marca são removidas do sangue e degradadas nos lisossomos dos hepatócitos; um mecanismo semelhante é utilizado para a retirada de hemácias "velhas" da circulação de mamíferos.

A ligação de um determinado oligossacarídio a uma proteína recém-sintetizada define qual será o seu destino: uma organela intracelular, a membrana plasmática ou a exportação para fora da célula.

7.4 TRANSPORTE ATRAVÉS DE MEMBRANAS

7.4.1 TRANSPORTE DE ÍONS E MOLÉCULAS PEQUENAS

As membranas biológicas são permeáveis apenas a moléculas solúveis em lipídios, por exemplo, ácidos graxos e esteróides, ou a moléculas pequenas como as dos gases oxigênio, CO_2 e nitrogênio.

A maioria das moléculas solúveis em água não podem atravessar livremente as membranas por simples difusão, devido ao caráter hidrofóbico da bicamada lipídica. Apesar disto, íons (H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-) e metabólitos polares (piruvato, açúcares, nucleotídios, aminoácidos) estão em fluxo constante através de membranas, graças a sistemas de transporte especializados, constituídos por proteínas integradas das membranas celulares. Muitas dessas proteínas transportadoras apresentam subunidades ou domínios com estrutura em α-hélice ou folha β pregueada que se organizam de modo a formar um canal que é preenchido por água, possibilitando a livre passagem de determinados íons ou moléculas polares. A proteína que constitui o canal, em alguns casos, não se liga aos compostos transferidos. Outras proteínas transportadoras, denominadas *permeases* ou *translocases*, são capazes de ligar-se reversivelmente a um composto específico de um lado da membrana e transportá-lo para o outro. O transporte por permeases obedece a uma cinética semelhante à descrita por Michaelis-Menten para a reação enzimática (Seção 5.5): a velocidade do transporte aumenta com a concentração do metabólito até atingir uma velocidade máxima, por saturação da permease. Da mesma forma que as enzimas, as translocases são específicas e inibidas competitivamente por análogos estruturais do metabólito que transportam e não-competitivamente por reagentes que se ligam a grupos essenciais da proteína transportadora. Muitas permeases são *cotransportadoras*, ou seja, o transporte de uma molécula depende da transferência simultânea de outra molécula, no mesmo sentido (*simporte*) ou no sentido oposto (*antiporte*). Outras translocases transportam apenas um composto: são *uniportadoras*.

O transporte de compostos mediado por translocases pode ser feito a favor ou contra um gradiente de concentração. No primeiro caso, quando o composto passa de um compartimento, onde a sua concentração é maior, para outro, onde ela é menor, é chamado de *transporte facilitado* ou *passivo*. Quando o transporte ocorre contra um gradiente de concentração, ele requer fornecimento de energia e é dito *transporte ativo*. Esta energia pode ser suprida diretamente pela hidrólise de ATP ou pelo gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons acoplado à cadeia de transporte de elétrons. Exemplos de permeases serão apresentados no estudo do transporte de metabólitos através da membrana interna da mitocôndria (Seção 11.10).

7.4.2 TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS E PARTÍCULAS: ENDOCITOSE E EXOCITOSE

O transporte de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídios etc.) e partículas através das membranas celulares não é feito por permeases devido ao seu tamanho; esses componentes são englobados em vesículas delimitadas por membranas, que podem ser internalizadas ou exteriorizadas em processos denominados *endocitose* e *exocitose*, respectivamente. A exocitose ocorre por fusão de vesículas intracelulares com a membrana plasmática; na endocitose, formam-se vesículas a partir de segmentos da membrana plasmática que sofrem invaginação, englobando parte do fluido extracelular, juntamente com os solutos nele presentes.

Um tipo especial de endocitose, a *endocitose adsortiva* ou *endocitose mediada pelo receptor*, é altamente seletivo, porque requer a ligação da molécula (ou partícula) a ser internalizada a receptores específicos da membrana plasmática. A endocitose adsortiva ocorre em eucariotos, sendo utilizada, por exemplo, para o fornecimento de colesterol para as células. O colesterol, necessário para a síntese de membranas e de vários compostos importantes desses organismos, é transportado no interior das LDL, na forma esterificada.

O transporte por endocitose (Fig. 7.3) inicia-se com a adsorção das LDL às células, graças à ligação de suas apolipoproteínas a receptores específicos, presentes na superfície externa da membrana plasmática. Os complexos receptor-LDL localizam-se em depressões da membrana plasmática que apresentam, na face em contato com o citoplasma, uma rede formada por uma proteína fibrosa, a *clatrina*. Estas depressões, chamadas *depressões revestidas*, são a seguir invaginadas, desprendendo-se da membrana e originando, no citoplasma, as *vesículas revestidas*. O revestimento formado pela clatrina é flexível, facilitando o brotamento da vesícula a partir da membrana plasmática. Após perderem

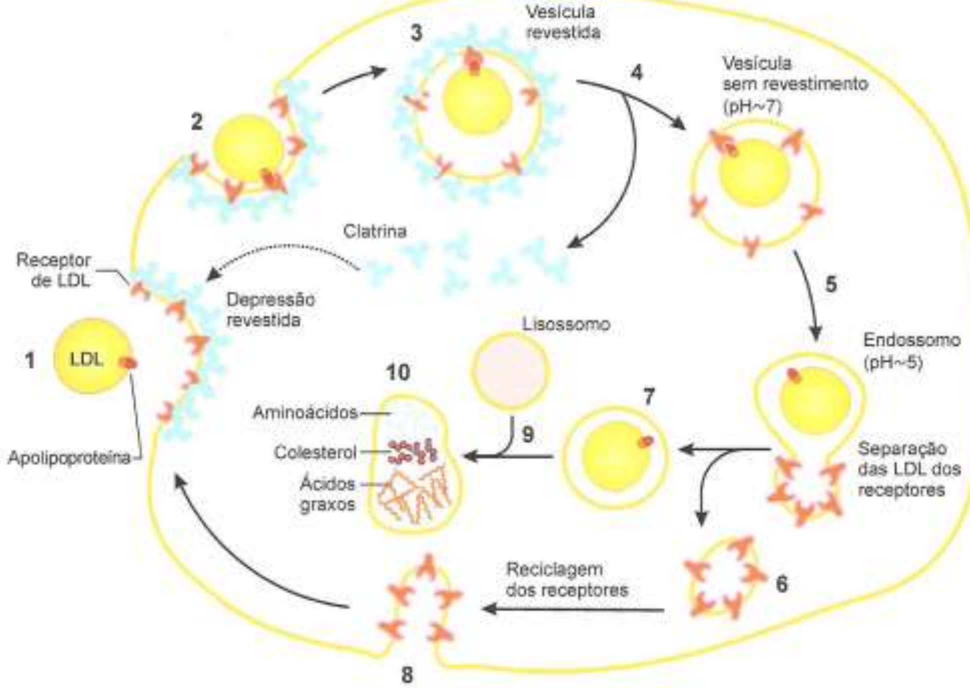


Fig. 7.3 Transporte de colesterol das LDL plasmáticas para dentro da célula por endocitose adsortiva. As LDL ligam-se, por suas apolipoproteínas, a receptores da membrana plasmática, em depressões revestidas (1). Por invaginação (2), a depressão forma uma vesícula revestida (3) que, em seguida, perde o invólucro de clatrina (4). A vesícula resultante funde-se com um endossomo (5), cujo pH ácido determina a dissociação entre as LDL e os seus receptores. Estes e as LDL concentram-se em regiões distintas do endossomo, que se divide em duas partes: uma estrutura alongada contendo os receptores (6) e uma vesícula contendo as LDL (7). A estrutura com os receptores vazios funde-se com a membrana plasmática, reciclando os receptores para novos ciclos de endocitose (8). A vesícula contendo as LDL funde-se com um lisossomo (9) cujas hidrolases liberam aminoácidos, a partir das apolipoproteínas, e ácidos graxos e colesterol, a partir dos ésteres de colesterol (10).

esse revestimento, as vesículas fundem-se com organelas chamadas *endossomos*, cujo pH ácido induz a dissociação das LDL de seus receptores. Estes e as LDL concentram-se em regiões distintas do endossomo, que se organiza em duas vesículas com destinos diferentes. Aquela que contém as LDL funde-se com um lisossomo, onde seus componentes são hidrolisados: as apolipoproteínas originam aminoácidos e os ésteres de colesterol produzem ácidos graxos e colesterol, que pode, então, ser utilizado pela célula. Os receptores de LDL são reciclados por fusão da vesícula onde eles se localizam com a membrana plasmática; podem, assim, participar de um novo ciclo de endocitose. O colesterol que excede as necessidades celulares é reesterificado para armazenamento como gotículas intracelulares.

Há casos excepcionais em que macromoléculas penetram nas células, por mecanismos ainda pouco conhecidos, como acontece com o DNA na transformação genética (aquisição de informação genética a partir de DNA exógeno).

BIBLIOGRAFIA

Alberts B et al: *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Publishing, 2002.
Lodish H et al: *Molecular Cell Biology*, 5th ed. W.H. Freeman & Company, 2004.
Schultz SG et al (editors): *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders*. Plenum Press, 1996.
Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175** (23):720-731, 1972.
Singer SJ: Some early history of membrane molecular biology. *Annu Rev Physiol* **66**:1-27, 2004.

PARTE 3

METABOLISMO: VIAS PRINCIPAIS

8

Introdução ao Metabolismo

Os organismos dependem do meio ambiente para obter energia e moléculas precursoras

Para manterem-se vivos e desempenharem diversas funções biológicas, os organismos necessitam continuamente de energia. De fato, qualquer organismo vivo constitui, no seu conjunto, um sistema estável de reações químicas e de processos físico-químicos mantidos afastados do equilíbrio; a manutenção deste estado contraria a tendência termodinâmica natural de atingir o equilíbrio e só pode ser conseguida à custa de energia, retirada do meio ambiente. Como, por outro lado, os organismos perdem energia para o meio ambiente, sua estabilidade deve ser vista como um processo dinâmico, o chamado *"steady-state"*, que pode ser comparado a um reservatório de um líquido, alimentado por fluxo idêntico à vazão. A comparação é válida para a massa de compostos químicos recebidos e eliminados, e também para o suprimento e a perda de energia. Alguns organismos, chamados *fototróficos* (Capítulo 15), estão adaptados a obter a energia de que necessitam da luz solar; outros, os *quimiotróficos*, obtêm energia oxidando compostos encontrados no meio ambiente. Dentre os quimiotróficos, certos microrganismos são capazes de oxidar compostos inorgânicos — são chamados, então, quimio*lito*tróficos. A maioria dos microrganismos e todos os animais são, entretanto, quimi*organo*tróficos, por necessitarem oxidar substâncias orgânicas.

As substâncias oxidáveis utilizadas pelos seres humanos, em particular, estão presentes nos seus alimentos, sob a forma de carboidratos, lipídios e proteínas. Há também reservas endógenas de carboidratos e lipídios, que são oxidadas nos intervalos entre as refeições.

Os nutrientes, ao serem oxidados, perdem prótons e elétrons ($H^+ + e^-$) e têm seus átomos de carbono convertidos a CO_2. Os prótons e elétrons são recebidos por coenzimas na forma oxidada, que passam assim à forma reduzida (Fig. 8.1). A reoxidação das coenzimas é obtida pela transferência dos ($H^+ + e^-$) para o oxigênio molecular, que é

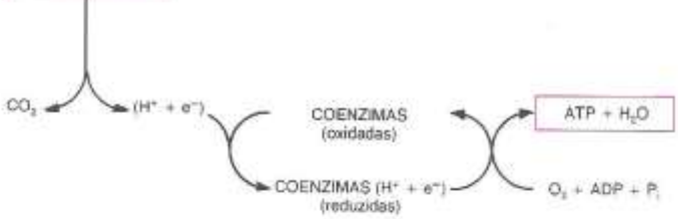


Fig. 8.1 Esquema simplificado do processo de obtenção de energia em organismos quimiorganotróficos: a oxidação de nutrientes leva à redução de coenzimas que são oxidadas por O_2, produzindo ATP. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4).

então convertido a água (Capítulo 11). A energia derivada desta oxidação é utilizada para sintetizar um composto rico em energia, a *adenosina trifosfato (ATP)*, a partir de *adenosina difosfato (ADP)* e *fosfato inorgânico* (HPO_4^{2-} a pH 7,4). É a energia química do ATP a que será usada para promover os processos biológicos que consomem energia. Em resumo, para que a energia derivada da oxidação dos alimentos possa ser usada pelas células, ela deve estar sob a forma de ATP.

O aproveitamento da energia do ATP é feito associando a remoção de seu grupo fosfato terminal aos processos que requerem energia (Fig. 8.2). Desta forma, a energia química armazenada no ATP pode ser utilizada em processos químicos (biossínteses), mecânicos (contração muscular), elétricos (condução de estímulo nervoso), osmóticos (transporte ativo através de membranas), luminosos (bioluminescência) etc. Como foi introduzido no Capítulo 4, a retirada do grupo fosfato terminal do ATP, para acionar a maioria das atividades celulares endergônicas, ***não*** é feita por hidrólise. A reação de hidrólise tem um valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo, mostrando ser termodinamicamente viável.

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i + H^+ \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -31\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Entretanto, a velocidade desta reação, não-catalisada, é convenientemente baixa. Existem enzimas que promovem esta reação, mas não indiscriminadamente. As enzimas que catalisam a hidrólise de ATP, as *ATPases*, atuam sempre associadas a processos que requerem energia e têm sua atividade rigorosamente controlada. Se assim não fosse, a ação dessas enzimas tornaria qualquer célula inviável, já que este composto imprescindível, uma vez produzido, seria prontamente hidrolisado. Além disso, e mais importante, a energia liberada pela reação de hidrólise seria dissipada como calor, uma forma de energia que não pode ser aproveitada pelas células.

O mecanismo de utilização da energia do ATP é mais complexo e, comumente, envolve a transferência do grupo fosfato para moléculas aceptoras (X):

$$\text{ATP} + X \longrightarrow X\text{–}\textcircled{P} + \text{ADP} \qquad \textcircled{P} = PO_3^{2-}$$

Esta transferência possibilita efetuar transformações importantes nas células, como a síntese de compostos fosforilados que não podem ser produzidos diretamente, por reação com fosfato inorgânico. Seguem-se alguns exemplos para entender como a energia do ATP é aproveitada.

O metabolismo de glicose, em todas as células, inicia-se com a transformação deste açúcar em glicose 6-fosfato. A glicose 6-fosfato poderia ser obtida a partir de glicose e fosfato:

$$\text{Glicose} + \text{Fosfato} \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +14\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Mas o valor positivo do $\Delta G^{\circ\prime}$ desta reação informa sobre sua inviabilidade. O recurso biológico para contornar a dificuldade termodinâmica desse caminho é empregar uma *outra* reação, da qual participa o ATP, e que é termodinamicamente viável:

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP} + H^+ \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -17\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

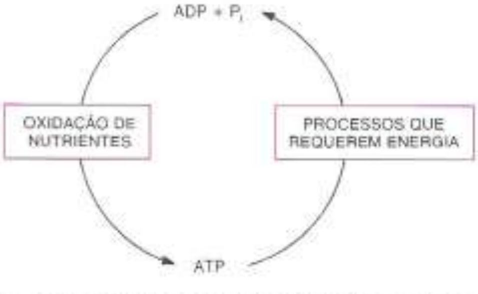


Fig. 8.2 Os processos biológicos utilizam a energia do ATP, sintetizado por oxidação de nutrientes.

Neste sentido, costuma-se dizer, com pouco rigor, que o ATP "doa" energia para tornar possíveis reações energeticamente inviáveis. Como foi visto neste exemplo, o ATP não "doa" energia — ele apenas participa de uma reação exeqüível.

Um outro exemplo comum nas reações metabólicas são as sínteses. Suponha-se a reação de condensação de A e B, com $\Delta G^{\circ\prime}$ desfavorável:

$$A + B \longrightarrow A{-}B \qquad \Delta G^{\circ\prime} > 0 \qquad (1)$$

Este problema também é contornado pela participação do ATP. Um caminho possível é a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para o composto A, reação esta termodinamicamente viável:

$$A + ATP \longrightarrow A\text{-fosfato} + ADP \qquad \Delta G^{\circ\prime} < 0 \qquad (2)$$

O composto A fosforilado pode reagir com B, em uma reação também termodinamicamente favorável, liberando fosfato e produzindo o composto de condensação:

$$A\text{-fosfato} + B \longrightarrow A{-}B + \text{Fosfato} \qquad \Delta G^{\circ\prime} < 0 \qquad (3)$$

O resultado da soma das reações (2) e (3) é:

$$A + B + ATP \longrightarrow A{-}B + ADP + \text{Fosfato} \qquad \Delta G^{\circ\prime} < 0 \qquad (4)$$

Uma comparação apressada entre as reações (1) e (4) poderia levar à seguinte conclusão *incorreta*: a condensação de A e B tornou-se possível porque a conversão de ATP em ADP e fosfato "deu" energia para o processo. Como já foi enfatizado, tal conversão liberaria energia apenas como calor. O que de fato ocorreu foram as reações intermediárias (2) e (3) que resultaram no produto desejado.

Os compostos químicos presentes nos organismos não são permanentes

Até aqui foi enfatizada a dependência dos organismos quanto à obtenção de energia, proveniente da luz ou de substâncias oxidáveis. Os seres vivos dependem do meio ambiente também quanto a um segundo aspecto: a necessidade de compostos químicos para conservação e/ou aumento de sua massa. O aumento de massa ocorre imediatamente após a divisão celular, até que as células-filhas atinjam a massa da célula que lhes deu origem. Os indivíduos em etapas de crescimento têm esta necessidade acentuada, mas, mesmo em um ser adulto, ela permanece. De fato, os compostos presentes em um organismo não são estáveis, sofrendo um contínuo processo de degradação; a estabilidade de sua composição e de suas estruturas depende, portanto, de uma reposição também contínua. Tal reposição é conseguida à custa de substâncias presentes no meio ambiente.

Os tipos de compostos exigidos por cada organismo diferem extraordinariamente. Alguns necessitam apenas de CO_2, H_2O e sais minerais e, a partir destas substâncias, são capazes de sintetizar todos os outros compostos de que necessitam — é o caso de algumas bactérias e todos os vegetais. Outros devem receber do meio ambiente um conjunto variado de substâncias, cuja composição varia com a espécie. Como cada organismo contém substâncias que lhe são características e só ele mesmo pode produzir, o que deve ser obtido do meio são os precursores dessas substâncias. Mesmo substâncias de constituição complexa são satisfatórias, pois os organismos são capazes de decompô-las e, reorganizando seus componentes, transformá-las em substâncias próprias. Para seres vivos muito simples, como as bactérias, a etapa de separação dos componentes se passa exteriormente, por ação de enzimas hidrolíticas secretadas para o meio ambiente; para os animais superiores, esta etapa é cumprida pela digestão. Em ambos os casos, as substâncias complexas são resolvidas até seus elementos constituintes, que são então absorvidos e distribuídos pelas células do organismo; intracelularmente, dá-se a reorganização dos elementos precursores segundo o padrão peculiar do ser vivo em questão.

Todo esse processo de obtenção, armazenamento e utilização de energia, e a transformação de precursores conseguidos do meio em compostos característicos de cada organismo, é efetuado por uma intrincada rede de milhares de reações químicas e constitui o *metabolismo*. As reações que compõem o metabolismo organizam-se em *vias metabólicas*, que são seqüências definidas de reações enzimáticas específicas. As vias metabólicas funcionam de modo inter-relacionado e extremamente coordenado. No próximo capítulo será analisada uma primeira via metabólica, a *glicólise* ou *via glicolítica*.

Os mamíferos não efetuam determinadas conversões entre os macronutrientes

Três tipos de compostos orgânicos — carboidratos, lipídios e proteínas — constituem, em massa, os componentes mais importantes dos alimentos; por esta razão são chamados *macronutrientes*. No processo digestivo os macronutrientes são degradados até suas unidades constituintes. A seguir, estão indicadas as unidades principais dos macronutrientes.

Carboidratos -------------- Glicose
Lipídios -------------------- Ácidos graxos
Proteínas ------------------- Aminoácidos

Ao longo dos próximos capítulos, será descrito o metabolismo destes compostos. Antes disso, é necessário fazer algumas considerações de ordem geral, que permitirão uma visão integrada das vias metabólicas a serem analisadas posteriormente.

Nesta abordagem preliminar, pretende-se responder às seguintes perguntas, relativas aos macronutrientes:

— Já que o organismo contém carboidratos, lipídios e proteínas, é obrigatória a ingestão dos três tipos de macronutrientes?

— Ou algum deles pode ser sintetizado a partir de outro?

— Se este for o caso, quais os tipos (ou qual o tipo) de macronutrientes imprescindíveis na dieta?

Ou seja, supondo que indivíduos recebessem em sua dieta ***apenas*** carboidratos, ***ou*** lipídios, ***ou*** proteínas (sem outras restrições dietéticas), quais deles sobreviveriam? A resolução destas questões pode ser obtida pela análise das possibilidades de interconversão dos diferentes tipos de nutrientes. Para tanto está apresentado na Fig. 8.3 um mapa muito simplificado e geral de uma parte do metabolismo. Neste mapa, ao lado do nome dos compostos aparece, entre parênteses, o número de átomos de carbono que os constituem. A abreviação acetil-CoA refere-se à acetil-coenzima A, ou seja, à coenzima A (Seção 9.2) ligada ao grupo acetila. Estão indicados 10 dos 20 aminoácidos constituintes das proteínas, separados em quatro grupos; os outros aminoácidos estariam localizados em um destes grupos. A análise das interconversões deve levar em consideração que, para sintetizar uma proteína, há necessidade de todos os 20 aminoácidos (representados, na Fig. 8.3, por 10 aminoácidos).

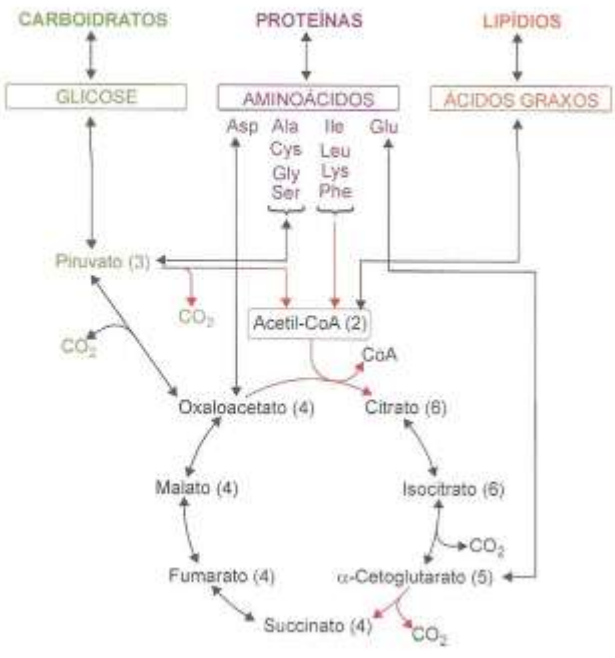


Fig. 8.3 Mapa simplificado de parte do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. As setas indicam, em alguns casos, reações e, em outros, etapas de vias metabólicas compostas por várias reações. As reações ou etapas irreversíveis estão assinaladas em vermelho.

Para determinar quais são as conversões exeqüíveis entre os macronutrientes ou as suas unidades constituintes, verificar se é possível sintetizar:

a. Glicose a partir de proteína
b. Ácido graxo a partir de proteína
c. Ácido graxo a partir de glicose
d. Proteína a partir de glicose
e. Glicose a partir de ácido graxo
f. Proteína a partir de ácido graxo

As soluções são conseguidas com as informações oferecidas pela Fig. 8.3, na qual se deve observar que:

1. A maioria das reações é reversível, mas algumas são irreversíveis, a saber:
   Piruvato → Acetil-CoA
   Acetil-CoA + Oxaloacetato → Citrato + CoA
   α-Cetoglutarato → Succinato
   Ile, Leu, Lys, Phe → Acetil-CoA
2. A degradação de carboidratos, lipídios e proteínas converge para um composto comum, a acetil-CoA.

Pode-se, então, construir a tabela a seguir, mostrando as etapas percorridas para cada conversão possível.

Conversões	Possível?	Etapas
a. Proteína → Glicose	Sim	1) Ala, Cys, Ser, Gly → Piruvato → Glicose 2) Asp → Oxaloacetato → Piruvato → Glicose
b. Proteína → Ácido graxo	Sim	1) Ala, Cys, Ser, Gly → Piruvato → Acetil-CoA → Ácido graxo 2) Ile, Leu, Lys, Phe → Acetil-CoA → Ácido graxo
c. Glicose → Ácido graxo	Sim	Glicose → Piruvato → Acetil-CoA → Ácido graxo
d. Glicose → Proteína	Não	
e. Ácido graxo → Glicose	Não	
f. Ácido graxo → Proteína	Não	

Os itens *d, e, f* de fato não são possíveis. Na Fig. 8.3 vê-se que a glicose pode originar apenas alguns aminoácidos (Glicose → Piruvato → Ala, Cys, Gly Ser), não havendo via possível para a obtenção de Ile, Leu, Lys e Phe; na ausência do conjunto completo de aminoácidos, a síntese de proteínas é inviável. Igualmente impossível é a síntese de glicose a partir de ácido graxo. Na sua degradação, os ácidos graxos são convertidos a acetil-CoA, com *dois* átomos de carbono; este composto condensa-se com oxaloacetato (*quatro* carbonos), formando um composto de *seis* carbonos, o citrato, e liberando a coenzima A (CoA). Por reações subseqüentes, o citrato pode regenerar o oxaloacetato, mas deve-se notar que, nestas reações, há produção de *duas* moléculas de CO_2. Esta seqüência de reações pode ser assim resumida:

$$\text{Acetil-CoA (2)} + \text{Oxaloacetato (4)} \longrightarrow \text{Citrato (6)} + \text{CoA}$$
$$\text{Citrato (6)} \longrightarrow \text{Oxaloacetato (4)} + 2\,CO_2$$

Somando-se as duas reações, obtém-se:

$$\text{Acetil-CoA (2)} \longrightarrow 2\,CO_2 + \text{CoA}$$

Verifica-se, assim, que os dois carbonos do grupo acetila da acetil-CoA são eliminados sob a forma de CO_2 e que não pode haver síntese líquida de oxaloacetato (e, portanto, de glicose) a partir de acetil-CoA. Por razões análogas, não pode haver síntese de proteínas a partir de ácidos graxos.

O resultado geral das interconversões pode ser expresso mostrando o que cada macronutriente pode produzir:

Macronutriente	Pode originar
Proteínas	Carboidratos, ácidos graxos[1]
Carboidratos	Ácidos graxos[1]
Lipídios	—

Portanto, a pergunta apresentada anteriormente pode ser agora respondida: os indivíduos que recebessem apenas *proteínas* como macronutriente na dieta seriam os únicos a sobreviver.

Apesar do mapa metabólico utilizado ser bastante simplificado, as conclusões dele derivadas são corretas e serão ratificadas ao longo do estudo do metabolismo. Fica, portanto, ressaltada desde logo a extrema importância alimentar das proteínas, pois delas podem ser derivados os outros dois macronutrientes; a partir destes as proteínas não podem ser produzidas. A necessidade nutricional proteica fica ainda mais enfatizada com a antecipação de uma informação adicional: os organismos têm reservas de carboidratos e lipídios, mas não de proteínas.

O metabolismo será apresentado em duas etapas: descrição das vias metabólicas e análise de sua regulação

No presente texto, primeiramente serão analisadas as vias metabólicas principais, que, juntamente com esta *Introdução ao Metabolismo* (Capítulo 8), compõem a PARTE 3 — METABOLISMO: VIAS PRINCIPAIS (Capítulos 8 a 18). Na PARTE 4 — REGULAÇÃO DO METABOLISMO (Capítulos 19 a 22), serão apresentados inicialmente os mecanismos de que os seres vivos dispõem para controlar o seu metabolismo (Capítulo 19); em seguida, a regulação de cada via metabólica (Capítulo 20) e, por último, a regulação metabólica global, integrada, frente a diferentes situações fisiológicas (Capítulos 21 e 22).

O estudo das vias metabólicas ao longo deste livro adota um padrão de análise destinado a ressaltar os aspectos mais importantes das vias. Assim, em cada caso verifica-se quais são os:

1. substratos da via;
2. seus produtos;
3. compostos necessários para manter a via em funcionamento;
4. compostos indispensáveis para que a via possa ser iniciada;
5. passos irreversíveis;
6. mecanismos de regulação da via.

Da resolução dos itens 1 e 2 deriva-se a *equação geral* da via metabólica. Ela é a equação balanceada de todas as reações que compõem a via e, apesar de não representar uma reação química, mostra a transformação geral efetuada pela via em estudo (ver um primeiro exemplo, a equação geral da glicólise, à Seção 9.1). Adicionalmente, a equação geral mostra quais são os compostos necessários para manter a via em funcionamento (item 3), com exceção das enzimas que catalisam as reações da via. Já para identificar os compostos imprescindíveis para que a via se inicie (item 4), deve-se proceder a um estudo minucioso de todas as etapas que compõem a via. A análise do item 5 estabelece o sentido em que a via ocorre e, finalmente, a resposta ao item 6 permite entender como ela funciona em diferentes condições fisiológicas.

BIBLIOGRAFIA

Alberty RA: *Thermodynamics of Biochemical Reactions*. Wiley-Interscience, 2003.

Friedrich CG et al: Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: Emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol* **67** (7):2873-2882, 2001.

Smith E, Morowitz HJ: Universality in intermediary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (36):13168-73, 2004.

[1]Deve-se ressaltar que os ácidos graxos essenciais para os seres humanos (Capítulo 18) não podem ser sintetizados a partir de proteínas ou carboidratos, o que, todavia, não invalida as considerações de caráter geral aqui expostas.

9

Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA

A glicose é, quantitativamente, o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos. De fato, sua utilização como fonte de energia pode ser considerada universal, e, dos microrganismos aos seres humanos, quase todas as células são potencialmente capazes de atender a suas demandas energéticas apenas a partir deste açúcar. A glicose é imprescindível para algumas células e tecidos, como hemácias e tecido nervoso, por ser o único substrato que são capazes de oxidar para obter energia.

Apesar de a dieta humana conter pouca glicose livre, proporções consideráveis deste açúcar são ingeridas sob a forma de amido, sacarose e lactose. Na dieta norte-americana, por exemplo, 55% dos carboidratos aparecem como amido, 35% como sacarose, 5% como lactose e 5% como glicose e outros monossacarídios. O amido é digerido no trato digestivo até glicose, o açúcar que será afinal distribuído para os tecidos. A digestão de sacarose e lactose origina, além de glicose, frutose e galactose. O metabolismo da glicose será descrito a seguir; o metabolismo dos outros açúcares será analisado no Capítulo 13.

A oxidação de glicose a piruvato permite obter ATP; o piruvato pode ser oxidado a CO_2, aumentando muito a produção de ATP

A oxidação total da glicose (com consumo de O_2 e produção de CO_2 e H_2O) é um processo exergônico, que libera uma quantidade de energia equivalente a 2.870 kJ · mol^{-1}. Nas células, essa transformação é estritamente acoplada à síntese de ATP (a partir de ADP e P_i), um processo endergônico ($\Delta G^{\circ\prime} = +31$ kJ · mol^{-1}). A glicose constitui, então, uma fonte extracelular de energia livre, que pode ser conservada como ATP, a principal forma de energia utilizável pelos seres vivos.

A oxidação parcial de glicose a piruvato, sem o concurso do oxigênio, leva à produção de apenas uma pequena parcela — menos de 10% — do total de ATP obtido pela oxidação aeróbia de glicose. Ainda assim, os organismos anaeróbios conseguem suprir, com esse processo, toda a sua demanda energética. Nas células aeróbias, o piruvato pode ser totalmente oxidado, trazendo um enorme ganho na formação de ATP.

Um esquema geral da oxidação completa de glicose, até CO_2, está mostrado na Fig. 9.1. A etapa inicial, que se processa no citossol, consiste na conversão de glicose (C_6) a 2 piruvato (2 C_3) por meio de uma seqüência de reações denominada *glicólise*, uma via metabólica fundamental dos seres vivos. Seus produtos são ATP, ($H^+ + e^-$) — recebidos por coenzimas — e piruvato. A posterior oxidação do piruvato é feita no interior da mitocôndria, nas células que dispõem desta organela. Na mitocôndria, o piruvato, um composto de três carbonos, sofre uma descarboxilação, transformando-se em um composto com dois carbonos (C_2). Este combina-se com um composto de quatro carbonos (C_4), dando um

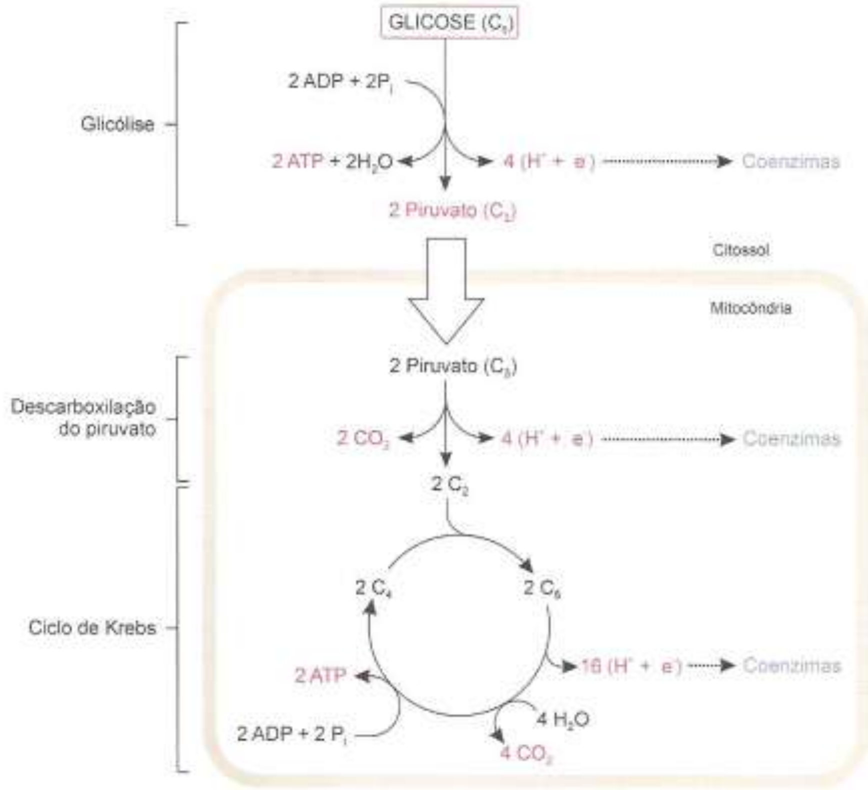


Fig. 9.1 Esquema da oxidação completa da glicose. No citossol, a glicose é oxidada a piruvato e este, na mitocôndria, é oxidado a CO_2. Os produtos da oxidação da glicose estão destacados em vermelho. Os ($H^+ + e^-$) são recebidos por coenzimas; da oxidação destas coenzimas por oxigênio resulta a síntese da maior parte do ATP obtido pela oxidação da glicose.

composto de seis carbonos (C_6). Por meio de uma seqüência cíclica de reações (ciclo de Krebs), C_6 perde dois carbonos sob a forma de CO_2 e regenera C_4.

Na mitocôndria, o piruvato é, então, oxidado a CO_2, com a concomitante produção de grande quantidade de ($H^+ + e^-$), sempre recebidos por coenzimas. Da oxidação destas coenzimas pelo oxigênio (Capítulo 11), deriva-se a grande produção de ATP conseguida pela oxidação adicional do piruvato e que perfaz cerca de 90% do total obtido com a oxidação completa da glicose.

As coenzimas que recebem os ($H^+ + e^-$) produzidos na oxidação da glicose são NAD^+ e FAD

Nas três etapas da oxidação da glicose — glicólise, descarboxilação do piruvato e ciclo de Krebs — os ($H^+ + e^-$) são produzidos em reações catalisadas por desidrogenases. Algumas desidrogenases utilizam como coenzima a *nicotinamida adenina dinucleotídio* (*NAD*$^+$), e outras, a *flavina adenina dinucleotídio* (*FAD*), derivados, respectivamente, das vitaminas nicotinamida e riboflavina (Fig. 9.2).

Nas reações com participação de NAD^+, há transferência de dois elétrons e um próton do substrato para o NAD^+, que se reduz a NADH; o outro próton é liberado no meio. Já o FAD recebe dois elétrons e dois prótons, reduzindo-se a $FADH_2$ (Fig. 9.3).

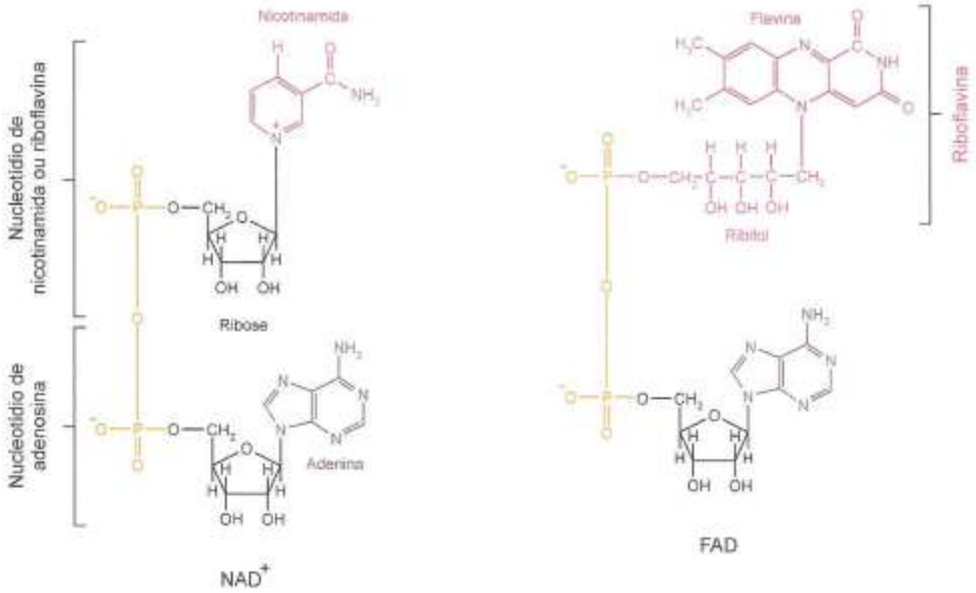


Fig. 9.2 Estrutura das formas oxidadas da nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) e da flavina adenina dinucleotídio (FAD). Cada nucleotídio é formado por uma base nitrogenada cíclica (nicotinamida, flavina ou adenina), uma ribose (ou o poliálcool ribitol) e um grupo fosfato. As vitaminas componentes das coenzimas estão destacadas em vermelho.

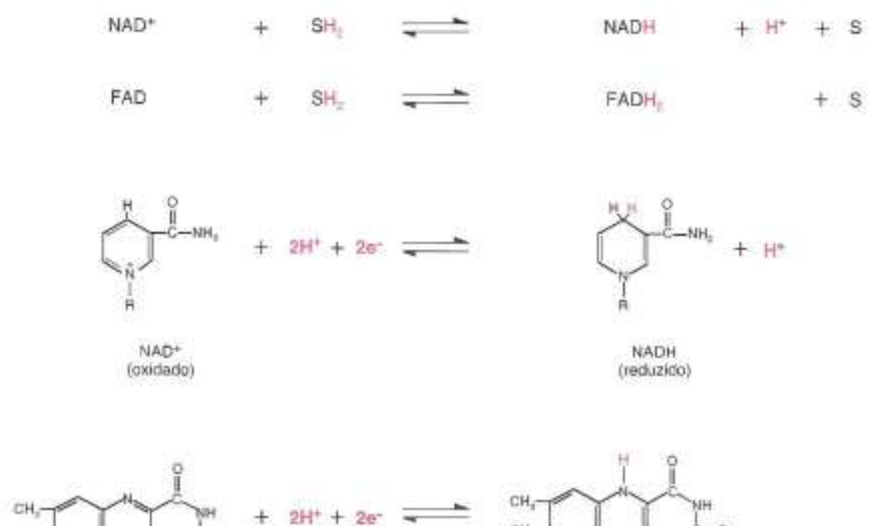


Fig. 9.3 Reações de óxido-redução catalisadas por desidrogenases que têm NAD^+ e FAD como coenzimas. O substrato reduzido (SH_2) é oxidado, perdendo dois átomos de hidrogênio, e as coenzimas convertem-se às suas formas reduzidas. O NAD^+ recebe dois elétrons e um próton, ficando o segundo próton no meio; o FAD recebe os dois átomos de hidrogênio. Estão representadas apenas as partes reativas do NAD^+ e FAD, o restante das moléculas sendo simbolizado por R.

9.1 GLICÓLISE: OXIDAÇÃO DE GLICOSE A PIRUVATO

A glicólise é uma via metabólica transdutora de energia livre, que provê as células com energia na forma de ATP

A glicólise pode ser dividida em quatro etapas para salientar os eventos fundamentais desta via (Fig. 9.4):

I. Dupla fosforilação da glicose (hexose), à custa de 2 ATP, originando uma outra hexose com dois grupos fosfato.
II. Clivagem desta hexose, produzindo duas trioses fosforiladas, que são interconvertíveis.
III. Oxidação e nova fosforilação das trioses fosfato, desta vez por fosfato inorgânico (P_i), formando duas moléculas de um intermediário com dois grupos fosfato.
IV. Transferência dos grupos fosfato deste intermediário para ADP, formando 4 ATP e 2 piruvato.

Estas quatro etapas constam de 10 reações seqüenciais que compõem a glicólise (Fig. 9.5).

Etapa I. A primeira reação da glicólise é a conversão de glicose a glicose 6-fosfato. A fosforilação da glicose a partir de glicose e fosfato inorgânico é uma reação inviável, por ter $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo (Capítulo 4). Por isto, os organismos utilizam uma outra reação de fosforilação da glicose que tem $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo, na qual o ATP é o doador de grupo fosfato. Esta reação é irreversível e catalisada por *hexoquinases*. (*Quinases* são enzimas que promovem a transferência de um grupo fosfato de um composto de alta energia, em geral ATP, para um composto aceptor.) As hexoquinases compõem uma família de enzimas ubíquas, que atuam sobre diversas hexoses. Nos tecidos de vertebrados, são encontradas quatro isoenzimas de hexoquinases, denominadas I a IV, que diferem por suas propriedades catalíticas, reguladoras, pela distribuição tecidual e localização intracelular. A hexoquinase IV é a isoenzima predominante em hepatócitos e células β do pâncreas; ela é comumente chamada de *glicoquinase*, embora não seja específica para glicose. A glicose 6-fosfato, ao contrário da glicose, é incapaz de atravessar a membrana plasmática, o que garante a sua permanência dentro das células.

Segue-se a isomerização da glicose 6-fosfato a frutose 6-fosfato, por ação de uma isomerase, a *fosfoglicoisomerase*, e nova fosforilação, análoga à anterior, também utilizando ATP e também irreversível, catalisada pela *fosfofrutoquinase 1* (*6-fosfofruto-1-quinase*). Forma-se, então, uma hexose com dois grupos fosfato: a frutose 1,6-bisfosfato.

Etapa II. A frutose 1,6-bisfosfato é clivada em diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato por ação da *aldolase*. Estas duas trioses fosforiladas são isômeras e, à semelhança do que ocorre com glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato, são interconvertidas por ação de uma isomerase específica, a *triose fosfato isomerase*. A conversão de diidroxiacetona fosfato

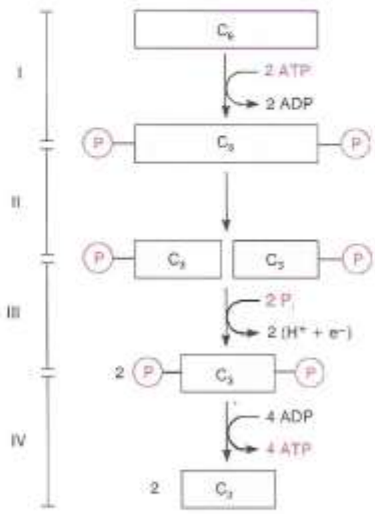


Fig. 9.4 Etapas fundamentais da glicólise. O símbolo (P) representa o grupo PO_3^{2-}, C_6 indica hexose e C_3, triose. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4).

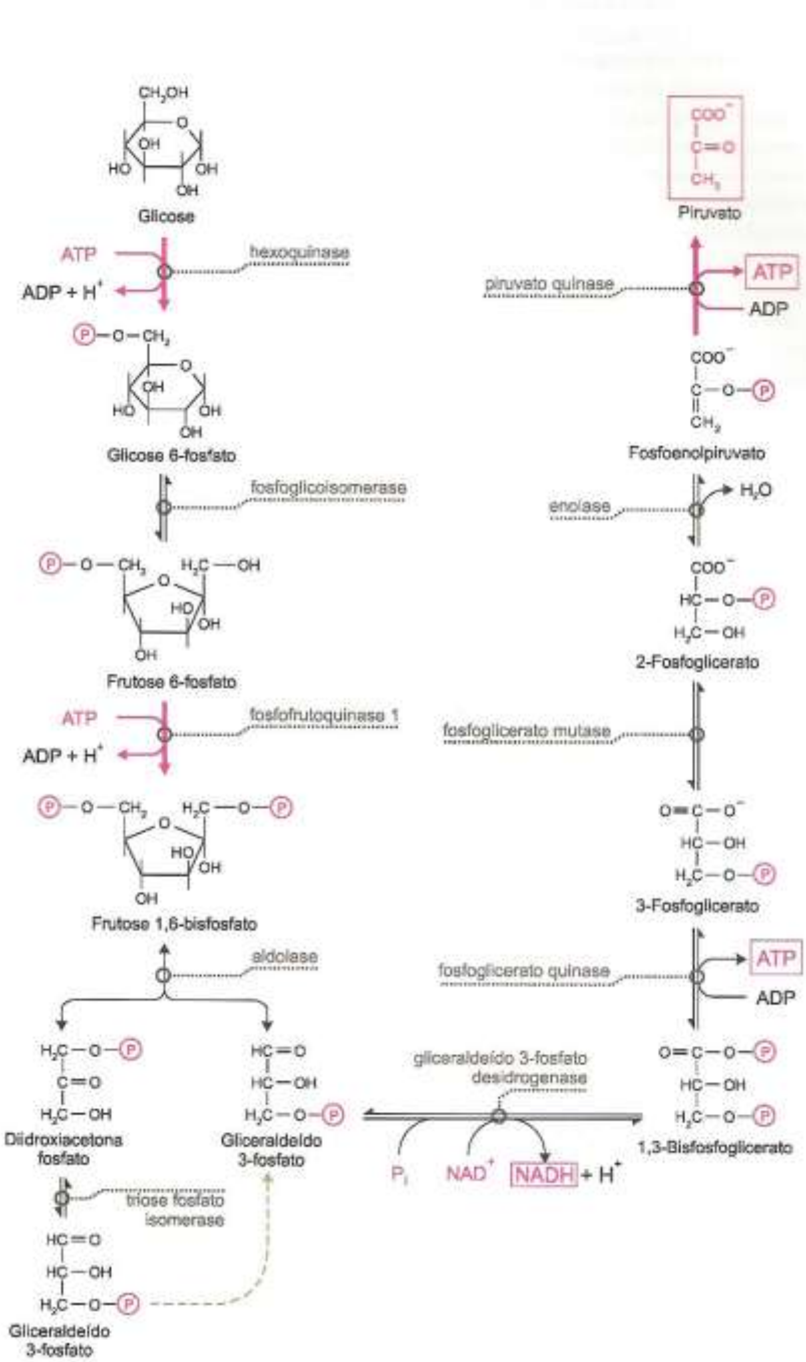


Fig. 9.5 Via glicolítica. Deve-se notar que a diidroxiacetona fosfato converte-se a gliceraldeído 3-fosfato, que prossegue a via glicolítica (seta verde tracejada). A partir de uma molécula de glicose, portanto, formam-se *duas* moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, que originam 2 NADH, 4 ATP e 2 piruvato. As setas vermelhas indicam reações irreversíveis.

em gliceraldeído 3-fosfato possibilita que *uma* molécula de glicose (C_6) seja convertida em *duas* moléculas de gliceraldeído 3-fosfato ($2 \times C_3$). Isto é, possibilita que todos os carbonos da glicose sejam oxidados a piruvato, ainda que somente o gliceraldeído 3-fosfato seja substrato da próxima enzima da via glicolítica. *Da reação da triose fosfato isomerase em diante, portanto, a via terá todos os seus intermediários duplicados.* A clivagem de frutose 1,6-bisfosfato e a isomerização de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato são reações termodinamicamente desfavoráveis. Isto significa que, no equilíbrio, predominam frutose 1,6-bisfosfato e diidroxiacetona fosfato, respectivamente. Apesar disso, as duas reações processam-se no sentido da formação de gliceraldeído 3-fosfato, graças à retirada contínua deste composto pelas reações subseqüentes.

Etapa III. As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato obtidas por fosforilação à custa de 2 ATP são novamente fosforiladas, agora por fosfato inorgânico, formando duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato. Este composto é um anidrido misto entre um ácido carboxílico e o ácido fosfórico, um anidrido carboxílico-fosfórico (Tabela 4.3, Seção 4.1); deste modo, o substrato, um aldeído, é oxidado a ácido. Trata-se de uma reação de óxido-redução/fosforilação complexa, catalisada pela *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*. Para facilitar a compreensão, a reação total pode ser desmembrada em duas reações parciais:

1. oxidação do aldeído (gliceraldeído 3-fosfato) a ácido carboxílico, com redução de NAD^+ a NADH, que é termodinamicamente favorável

$$2\,R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-H + 2\,NAD^+ + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-OH + 2\,NADH + 2\,H^+$$

2. ligação do ácido carboxílico com o ácido fosfórico (HPO_4^{2-} a pH 7,4), formando um anidrido carboxílico-fosfórico, que é endergônica

$$2\,R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-OH + 2\,HPO_4^{2-} \longrightarrow 2\,R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-PO_3^{2-} + 2\,H_2O$$

Na realidade, as duas reações ocorrem acopladas, permitindo que parte da energia liberada na reação de óxido-redução seja conservada na formação do anidrido carboxílico-fosfórico. O acoplamento é efetuado por um intermediário tioéster, rico em energia, resultante da oxidação do aldeído, que fica ligado à enzima. O mecanismo de ação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase está esquematizado na Fig. 9.6. O gliceraldeído 3-fosfato reage com o grupo sulfidrila de um resíduo de cisteína da enzima (etapa 1 na figura), formando-se um tio-hemiacetal[1]; segue-se a oxidação do tio-hemiacetal e a redução de um NAD^+ ligado à enzima, formando o intermediário tioéster (etapa 2); o NADH ligado

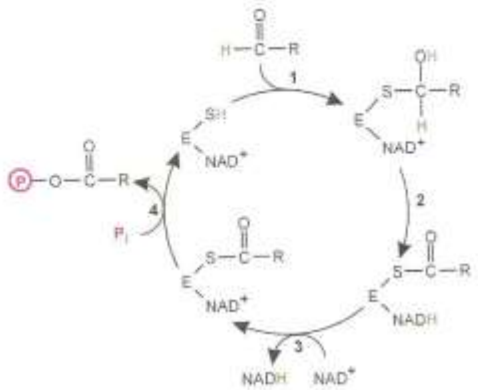


Fig. 9.6 Esquema da conversão de gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. As etapas 1 a 4 estão descritas no texto. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4); Ⓟ = PO_3^{2-}.

[1]Alcoóis podem reagir com o grupo carbonila de aldeídos formando hemiacetais; no caso de um *tioálcool* (grupo SH da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), origina-se um *tio*-hemiacetal.

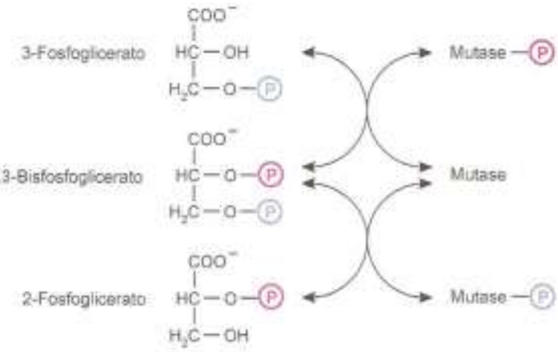


Fig. 9.7 Esquema da conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato mostrando a formação de um intermediário bisfosforilado.

à enzima é trocado por uma molécula livre de NAD^+ (etapa 3); o intermediário tioéster reage com fosfato inorgânico, formando o anidrido carboxílico-fosfórico, um composto rico em energia, e regenerando o grupo SH da enzima (etapa 4). A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é inibida por agentes específicos para grupos SH, como, por exemplo, o iodoacetato (Seção 5.7).

Etapa IV. Compreende dois eventos de formação de ATP. No primeiro, na reação catalisada pela *fosfoglicerato quinase*, o grupo fosfato da ligação anidrido do 1,3-bisfosfoglicerato é suficientemente rico em energia para poder ser transferido ao ADP, produzindo ATP. O segundo evento de síntese de ATP depende da conversão de uma *ligação éster fosfato* em uma *ligação fosfoenol*, rica em energia. Esta conversão se inicia com o deslocamento do grupo éster fosfato do 3-fosfoglicerato, do carbono 3 para o carbono 2. A *fosfoglicerato mutase*, um tipo particular de isomerase, catalisa esta transferência intramolecular do grupo fosfato. O processo envolve a formação intermediária de um composto bisfosforilado (2,3-bisfosfoglicerato), originado por doação de um grupo fosfato da própria enzima ao substrato (Fig. 9.7). Em seguida, a *enolase* promove a desidratação do 2-fosfoglicerato, originando o fosfoenolpiruvato. A formação deste composto rico em energia possibilita a síntese de ATP na reação subseqüente, irreversível, catalisada pela *piruvato quinase*.

Em resumo, na Etapa I ocorrem duas fosforilações por ATP e, na Etapa III, duas por fosfato inorgânico; na Etapa IV, os quatro grupos fosfato são transferidos para ADP, formando quatro ATP — para cada molécula de glicose convertida a duas de piruvato pela glicólise, são produzidos 4 ATP (2 por triose), dos quais devem ser descontados os 2 ATP consumidos inicialmente.

A equação geral da glicólise é:

$$\text{Glicose} + 2\,\text{ADP} + 2\,\text{P}_i + 2\,\text{NAD}^+ \longrightarrow 2\,\text{Piruvato} + 2\,\text{ATP} + 2\,\text{H}_2\text{O} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \quad (1)$$

Deve-se lembrar que uma equação geral ***não*** representa uma reação química; ela representa sempre e apenas o somatório das reações que compõem a via metabólica, omitindo, portanto, as reações intermediárias do processo. No caso em questão, por exemplo, se os compostos que aparecem no primeiro membro da equação forem adicionados a uma solução contendo todas as enzimas da glicólise, nenhuma reação ocorrerá, já que, para a primeira reação da glicólise, há necessidade de ATP.

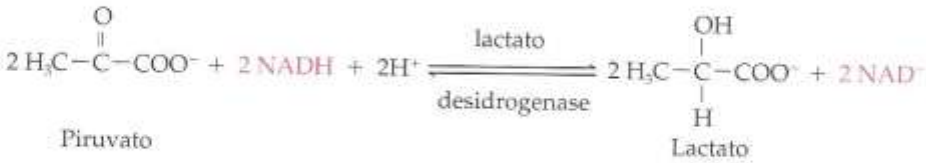
A equação geral da glicólise evidencia que a oxidação da glicose a piruvato e a produção de ATP estão associadas à redução de NAD^+. Como o NAD^+ existe nas células em concentrações limitantes, muito inferiores às dos substratos, o funcionamento da glicólise depende da reoxidação do NADH. Os seres vivos regeneram o NAD^+ por dois mecanismos diferentes, segundo a disponibilidade de oxigênio. Em *aerobiose*, utilizam o oxigênio para oxidar o NADH, assunto que será tratado no Capítulo 11; em *anaerobiose*, lançam mão de um outro processo para o mesmo fim, analisado a seguir.

9.1.1 GLICÓLISE ANAERÓBIA: FERMENTAÇÕES

Em anaerobiose, o próprio piruvato produzido pela glicólise (ou um composto dele derivado) serve como aceptor dos elétrons do NADH, assegurando o provimento de NAD^+. O piruvato é, portanto, o composto a partir do qual as oxidações aeróbia e anaeróbia da glicose divergem.

A glicólise anaeróbia é chamada *fermentação*. Existem muitos tipos diferentes de fermentações que obedecem, entretanto, a um padrão comum: uma primeira etapa, onde a glicose é convertida a piruvato, com produção de NADH, é seguida por uma segunda etapa de conversão de NADH a NAD^+. As fermentações diferem pelas reações que efetuam a regeneração do NAD^+. Segundo as enzimas de que a célula dispõe, o piruvato pode ser convertido a compostos diferentes, como, por exemplo, lactato, etanol, propionato, butirato etc., que são sempre excretados da célula. As fermentações são designadas segundo o produto final: *fermentação lática*, *alcoólica*, *propiônica* etc. As fermentações são processos ditos auto-suficientes, porque independem de outras vias para regenerar a coenzima NAD^+ que utilizam.

Na *fermentação lática*, o piruvato recebe os elétrons do NADH, reduzindo-se a lactato:



(2)

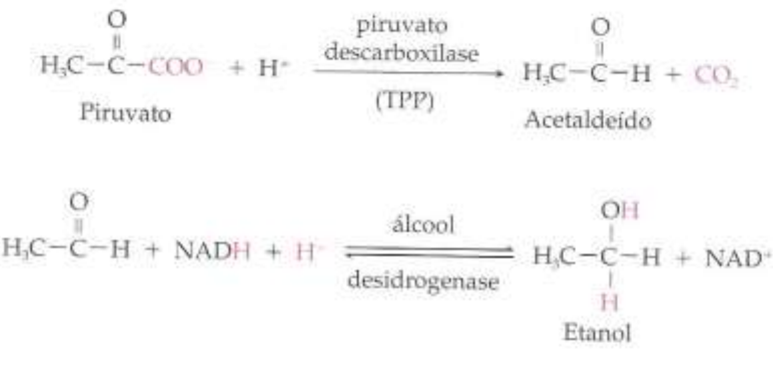
Este é o processo utilizado por diversos microrganismos e por determinadas células de mamíferos — hemácias, fibras musculares brancas e fibras musculares vermelhas sob contração vigorosa (Capítulo 22). Quando as fibras vermelhas são submetidas a esforço intenso, o oxigênio trazido pela circulação torna-se insuficiente para promover a oxidação da grande quantidade de NADH resultante do trabalho muscular, e a célula muscular fica submetida a uma anaerobiose relativa. A oxidação do NADH pelo piruvato gera o lactato caracteristicamente produzido por músculos em anaerobiose, permitindo que, pela regeneração do NAD^+, a glicólise possa prosseguir, formando ATP.

Somando-se a equação de conversão de glicose a piruvato (equação 1) à de conversão de piruvato a lactato (equação 2), obtém-se a equação geral da fermentação lática:

$$\text{Glicose} + 2\,\text{ADP} + 2\,P_i \longrightarrow 2\,\text{Lactato} + 2\,\text{ATP} + 2\,H_2O \qquad (3)$$

Esta equação geral, como todas, esconde etapas importantes da transformação: além da necessidade de ATP para iniciar a via, fica omitida a participação imprescindível do NAD^+, sem cuja presença a via não pode ser levada a cabo.

Em certos organismos, como as leveduras e alguns tipos de bactérias, a regeneração do NAD^+ é feita pela *fermentação alcoólica*. Nesta via, o piruvato é descarboxilado, originando acetaldeído, que, servindo como aceptor dos elétrons do NADH, reduz-se a etanol:



A coenzima da piruvato descarboxilase é a *tiamina pirofosfato* (*TPP*), que participa também da descarboxilação oxidativa do piruvato (Seção 9.2).

A equação geral da fermentação alcoólica é:

$$\text{Glicose} + 2\,\text{ADP} + 2\,P_i \rightarrow 2\,\text{Etanol} + 2\,CO_2 + 2\,\text{ATP} + 2\,H_2O \qquad (4)$$

O rendimento da glicólise anaeróbia é de 2 mols de ATP por mol de glicose

As fermentações lática e alcoólica resultam na produção líquida de 2 ATP, a partir de ADP e fosfato, como mostram as equações 3 e 4. O rendimento da oxidação anaeróbia da glicose é muito menor do que aquele da sua oxidação aeróbia: 2 mols *versus* 38 mols de ATP por mol de glicose. Como mencionado no início deste capítulo, grande número de microrganismos e também células de eucariotos são capazes de sobreviver à custa da glicólise anaeróbia.

O requerimento de ADP e P_i para a síntese de ATP faz antecipar a regulação da glicólise em células de mamíferos. Tendo em vista que as células dispõem de quantidades restritas de ADP, principalmente, e P_i, a continuidade da via fica atrelada à utilização de ATP, originando ADP e P_i, por processos que consomem energia.

A glicólise, como praticamente todas as vias metabólicas, é estritamente regulada por intermédio do controle da atividade e da síntese de algumas de suas enzimas, sujeitas a regulações alostéricas e hormonais. ***A descrição completa da regulação da glicólise encontra-se no Capítulo 20.***

9.2 CONVERSÃO DE PIRUVATO A ACETIL-CoA

Em condições aeróbias, o primeiro passo para a oxidação total do piruvato é a sua conversão a acetil-CoA. Nas células eucarióticas, o piruvato é transportado do citossol para a mitocôndria por uma permease específica (Seção 11.10) e é transformado em acetil-CoA, conectando, portanto, a glicólise e o ciclo de Krebs (Fig. 9.1). Assim sendo, o piruvato deixa de ser o aceptor dos elétrons do NADH produzido pela glicólise, e esta coenzima não será regenerada no citossol; será oxidada pelo oxigênio, aceptor final de elétrons no metabolismo aeróbio.

O piruvato origina acetil-CoA, por descarboxilação oxidativa, de acordo com a equação geral:

$$\underset{\text{Piruvato}}{H_3C-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-COO^-} + \underset{\text{Coenzima A}}{HS\text{-}CoA} + NAD^+ \longrightarrow \underset{\text{Acetil-CoA}}{H_3C-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-SCoA} + NADH + CO_2$$

O processo é irreversível e consiste basicamente na transferência do grupo acetila, proveniente da descarboxilação do piruvato, para a *coenzima A* (Fig. 9.8). Esta coenzima tem justamente a função de transportadora de grupos acila, aos quais se liga pelo seu grupo sulfidrila terminal, formando uma ligação tioéster, rica em energia.

A reação de formação de acetil-CoA a partir de piruvato ocorre em etapas seqüenciais, catalisadas por um sistema multienzimático, chamado *complexo piruvato desidrogenase*. O complexo contém três enzimas diferentes — *piruvato desidrogenase, diidrolipoil transacetilase* e *diidrolipoil desidrogenase* — e cinco coenzimas: *tiamina pirofosfato (TPP), coenzima A (CoA), nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+), flavina adenina dinucleotídio (FAD)* e *ácido lipóico* (Fig. 9.8). As quatro primeiras coenzimas — TPP, CoA, NAD^+ e FAD — são derivadas das vitaminas tiamina, ácido pantotênico, nicotinamida e riboflavina, respectivamente. O ácido lipóico está covalentemente ligado à diidrolipoil transacetilase e, graças à sua cadeia lateral longa e flexível, é capaz de interagir com os sítios ativos das duas outras enzimas do complexo, funcionando como um transferidor do grupo acetila. A oxidação de piruvato a acetil-CoA é um exemplo notável da utilização de vitaminas no metabolismo. Esta única transformação não pode ser realizada sem o concurso de *quatro* vitaminas.

A primeira etapa (Fig. 9.9) é a descarboxilação do piruvato e a ligação do grupo hidroxietila ao TPP, catalisada pela piruvato desidrogenase. Esta mesma enzima é responsável pela oxidação do grupo hidroxietila a acetila e sua transferência ao ácido lipóico, na sua forma oxidada (forma dissulfeto), que se reduz a ácido acetil-lipóico. O ácido lipóico é o cofator da próxima enzima do complexo, a diidrolipoil transacetilase; a enzima transfere o grupo acetila para a coenzima A, formando acetil-CoA e a forma dissulfidrila do ácido lipóico. Esta forma reduzida do ácido lipóico é oxidada pela terceira enzima, a diidrolipoil desidrogenase, uma flavoproteína contendo FAD como grupo prostético, que recebe os ($H^+ + e^-$) e os transfere finalmente para o NAD^+. O NADH formado será oxidado na cadeia de transporte de elétrons (Capítulo 11).

Uma só partícula do complexo piruvato desidrogenase é maior do que um ribossomo e consiste em um núcleo central formado por dezenas de moléculas de diidrolipoil transacetilase, às quais se unem dezenas de moléculas de piruvato desidrogenase e diidrolipoil desidrogenase. A associação das enzimas (por ligações não-covalentes) permite que essa reação complexa ocorra rápida e coordenadamente. Fazem parte ainda da partícula várias moléculas de enzimas reguladoras.

A regulação da atividade do complexo piruvato desidrogenase será descrita no Capítulo 20.

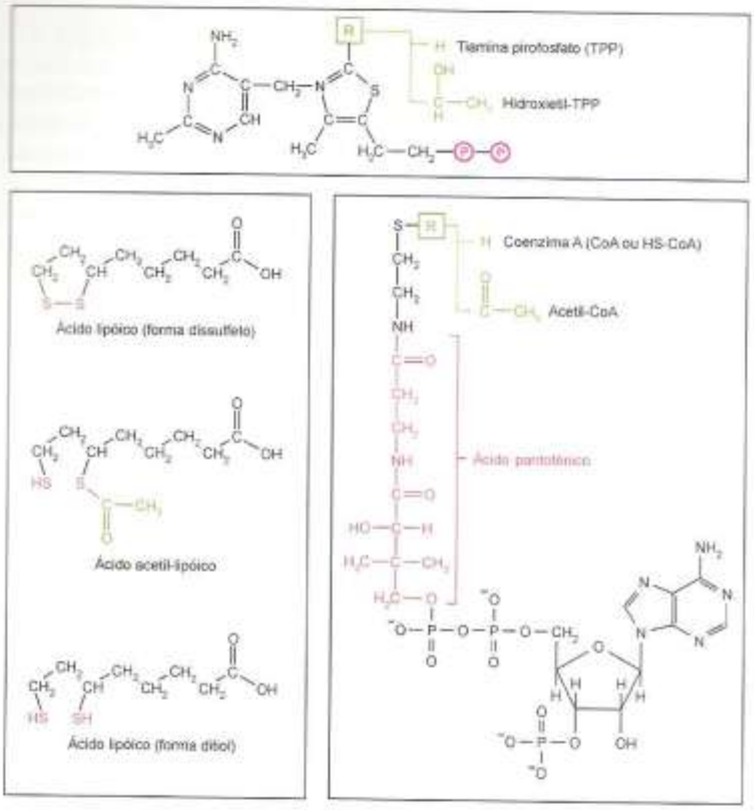


Fig. 9.8 Estrutura das coenzimas (exceto NAD^+ e FAD) que participam da oxidação de piruvato a acetil-CoA e dos seus derivados formados nesta reação.

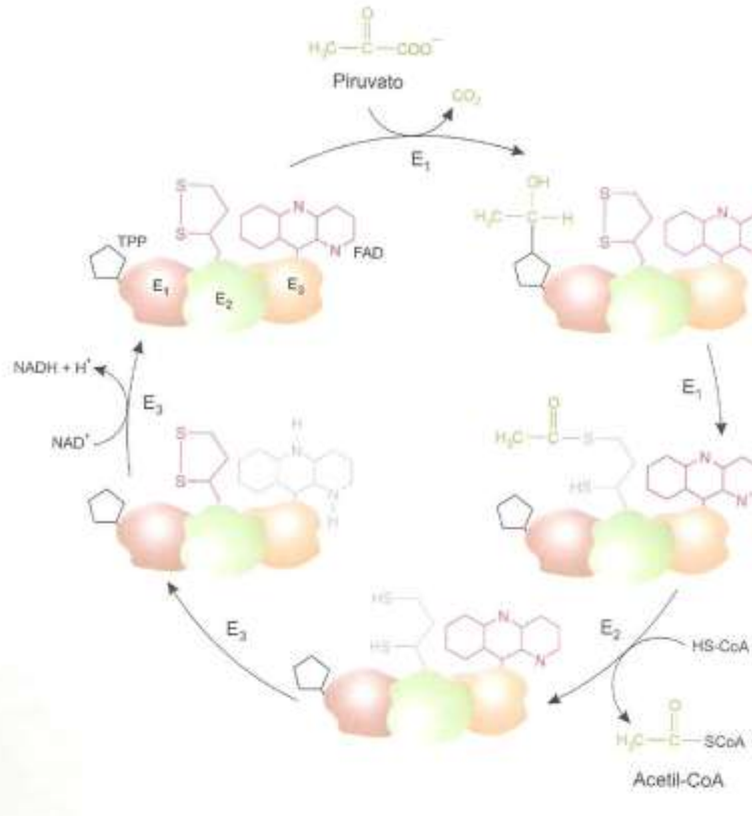


Fig. 9.9 Etapas da reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase, onde E_1, E_2 e E_3 representam respectivamente as enzimas: piruvato desidrogenase (TPP), diidrolipoil transacetilase (ácido lipóico) e diidrolipoil desidrogenase (FAD).

BIBLIOGRAFIA

Boyer PD (editor): *The Enzymes*, 3rd ed., vols. V, VII, VIII, IX, XI. Academic Press, 1970-1975.

Büchner E: Alkoholische Gährung ohne Hefezellen (Fermentação alcoólica em lisado de células de levedura). *Ber Dtsch Chem Ges* 30:117-124, 1897.

Cárdenas ML et al: Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* **1401**:242-264, 1998.

Dandekar T et al: Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem J* **343**:115-124, 1999.

Dixon M, Webb E: *Enzymes*, 3rd ed. Longman Group Limited, 1979.

Koebmann BJ et al: The glycolytic flux in Escherichia coli is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol* **184** (14):3909-3916, 2002.

Scriver CR et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Verlinde CL et al: Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat* **4** (1):50-65, 2001.

Wilson JE: Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* **206** (12):2049-2057, 2003.

10

Ciclo de Krebs

O piruvato formado a partir de glicose no citossol origina o grupo acetila presente na acetil-CoA mitocondrial. Além da glicose, vários aminoácidos produzem piruvato e, portanto, acetil-CoA, ao serem degradados. Outros aminoácidos e os ácidos graxos também produzem acetil-CoA sem a formação intermediária de piruvato (Fig. 8.3). A acetil-CoA constitui, portanto, o ponto de convergência do metabolismo degradativo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. Completando o catabolismo destes compostos, a acetil-CoA, qualquer que seja sua proveniência, será totalmente oxidada a CO_2 pelo ciclo de Krebs, com a concomitante produção de coenzimas reduzidas. Paralelamente a esta oxidação, o ciclo de Krebs produz diversos compostos utilizados como precursores para biossínteses.

10.1 REAÇÕES DO CICLO DE KREBS

O ciclo de Krebs (Fig. 10.1) inicia-se com a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato, formando citrato, uma reação catalisada pela *citrato sintase*. O citrato é isomerizado a isocitrato, por ação da *aconitase*, com a formação intermediária de *cis*-aconitato (Fig. 10.2). A *isocitrato desidrogenase* promove a oxidação de isocitrato a α-cetoglutarato, com redução de NAD^+ e liberação de CO_2. O α-cetoglutarato é transformado a succinil-CoA, graças à atuação da *α-cetoglutarato desidrogenase*, um complexo enzimático com mecanismo de reação semelhante ao complexo piruvato desidrogenase. Trata-se, em ambos os casos, da descarboxilação oxidativa de um α-cetoácido (piruvato ou α-cetoglutarato) e ligação do grupo remanescente (acetila ou succinila) à coenzima A, formando uma ligação tioéster rica em energia, com participação de TPP, ácido lipóico e FAD; esta reação também libera CO_2 e reduz NAD^+.

A seguir, a succinil-CoA é convertida a succinato e a energia da ligação tioéster é aproveitada para sintetizar a ligação anidrido fosfórico de um nucleosídio trifosfato (NTP) a partir de um nucleosídio difosfato (NDP) e P_i — a reação é catalisada pela *succinil-CoA sintetase* (ou *succinato-CoA ligase*). Existem várias isoenzimas da succinil-CoA sintetase que diferem quanto aos organismos onde são expressas e quanto à especificidade para os nucleotídios sobre os quais atuam: permitem a formação de ATP a partir de ADP e P_i ou de GTP (guanosina trifosfato – Fig. 10.3) a partir de GDP (guanosina difosfato) e P_i. A succinil-CoA sintetase encontrada em plantas origina ATP; nas bactérias, dependendo da espécie considerada, pode-se formar ATP ou GTP, ou ambos; em mamíferos, incluindo os seres humanos, as duas isoenzimas são expressas e as suas quantidades relativas variam segundo o tecido. O GTP pode ser utilizado em reações dele dependentes, como a síntese de fosfoenolpiruvato pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase mitocondrial, ou pode transferir um grupo fosfato ao ADP, produzindo ATP, por ação da *nucleosídio difosfato quinase*: $GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$.

O succinato é oxidado a fumarato pela *succinato desidrogenase*, cujo grupo prostético, FAD, é reduzido a $FADH_2$. A succinato desidrogenase é a única enzima do ciclo de Krebs que é parte integrante da membrana interna da mitocôndria; as demais estão em forma solúvel na matriz mitocondrial. O fumarato é hidratado a malato pela *fumarase*. A *malato desidrogenase* oxida o malato a oxaloacetato, reduzindo NAD^+ e fechando o ciclo. Como o oxaloacetato é sempre regenerado ao final de cada volta, o ciclo de Krebs pode oxidar acetil-CoA continuamente, sem gasto efetivo de oxaloacetato.

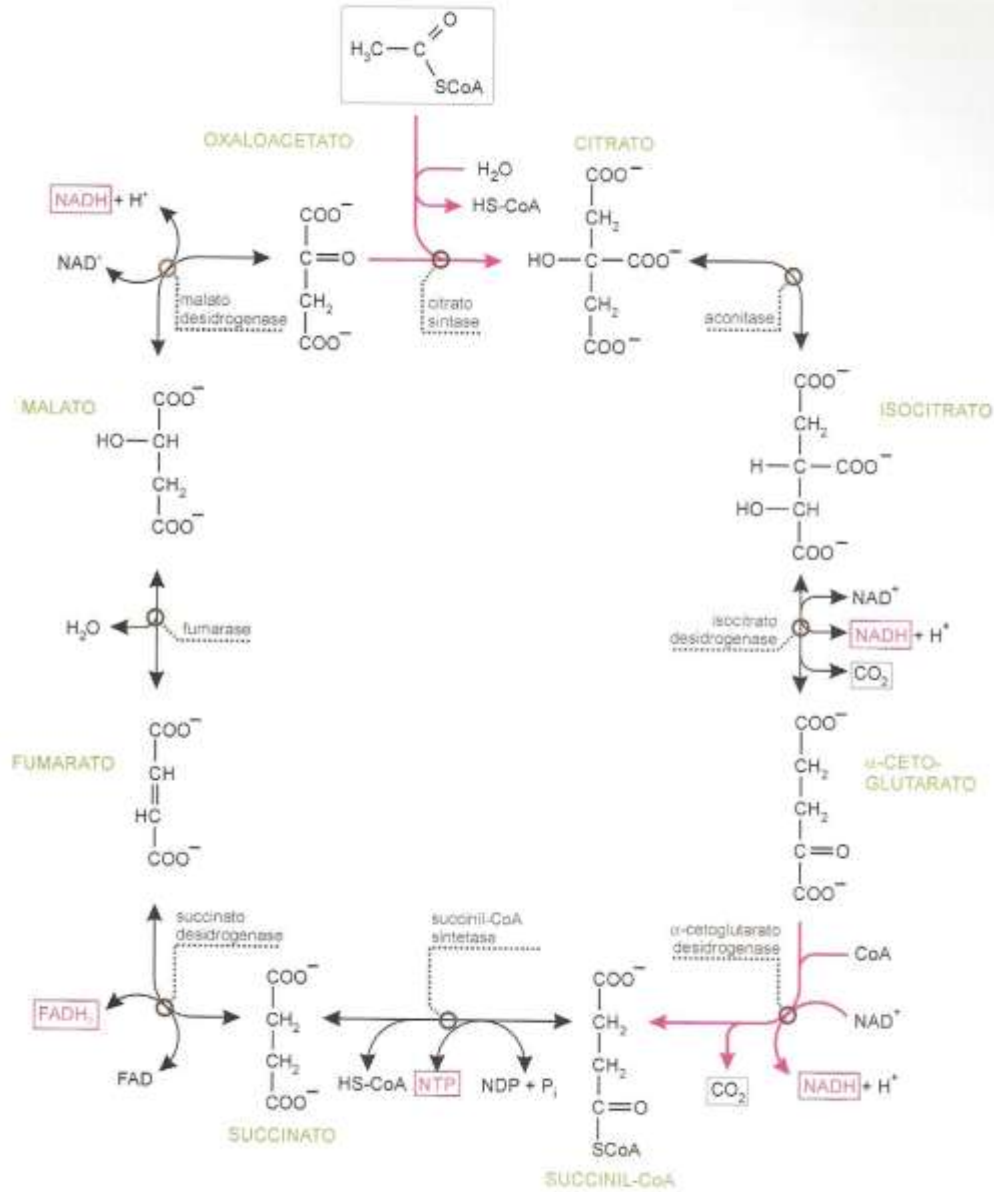


Fig. 10.1 Ciclo de Krebs. Na reação da succinil-CoA sintetase, o nucleosídio trifosfato (NTP) pode ser ATP ou GTP e o nucleosídio difosfato (NDP), ADP ou GDP.

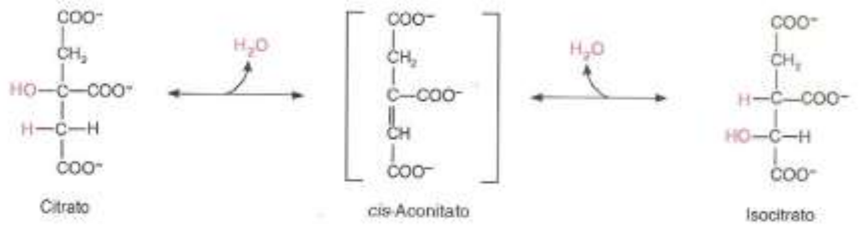


Fig. 10.2 A isomerização de citrato a isocitrato ocorre com a formação de um intermediário, o *cis*-aconitato.

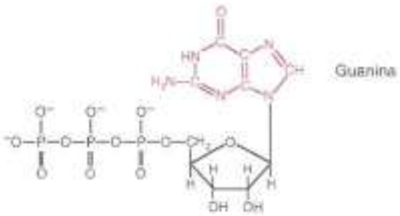


Fig. 10.3 O GTP difere do ATP por conter guanina como base nitrogenada.

Observa-se, pela descrição das reações que o compõem, que o ciclo de Krebs é uma via eminentemente oxidativa para a acetil-CoA: os átomos de carbono do seu grupo acetila são estequiometricamente convertidos a CO_2, e em paralelo a esta oxidação são reduzidos 3 NAD^+ e 1 FAD.

A maioria das reações do ciclo de Krebs é reversível, mas o sentido do ciclo é determinado pela irreversibilidade das reações catalisadas pela citrato sintase e α-cetoglutarato desidrogenase (setas coloridas na Fig. 10.1). Esta última reação mantém baixas as concentrações de α-cetoglutarato e, indiretamente, de isocitrato. Assim, apesar de o equilíbrio da reação catalisada pela aconitase favorecer acentuadamente a formação de citrato, este composto não se acumula na mitocôndria enquanto se processar a oxidação de isocitrato.

O ciclo de Krebs depende da cadeia de transporte de elétrons para a reoxidação de coenzimas

A equação geral do ciclo de Krebs é:

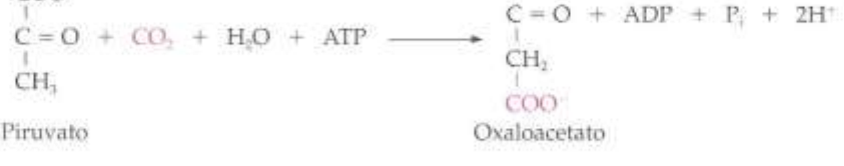
$$\text{Acetil-CoA} + 3\,NAD^+ + FAD + ADP\ (\text{ou GDP}) + P_i + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,CO_2 + 3\,NADH + 2\,H^+ + FADH_2 + ATP\ (\text{ou GTP}) + \text{HS-CoA}$$

Embora produza apenas 1 ATP (ou 1 GTP), o ciclo de Krebs contribui para a formação de grande parte do ATP produzido pela célula, pois a energia da oxidação da acetil-CoA é conservada sob a forma de coenzimas reduzidas e, posteriormente, usada para síntese de ATP. A oxidação das coenzimas é obrigatoriamente feita pela cadeia de transporte de elétrons (Capítulo 11) e, portanto, o ciclo de Krebs, assim como a conversão de piruvato a acetil-CoA, só pode funcionar em condições aeróbias, ao contrário da glicólise.

10.2 FUNÇÃO ANABÓLICA DO CICLO DE KREBS

A redução de coenzimas não é a única função do ciclo de Krebs

Os compostos intermediários do ciclo de Krebs podem ser utilizados como precursores em vias biossintéticas: oxaloacetato e α-cetoglutarato formam aspartato e glutamato, respectivamente; succinil-CoA é precursora do grupo heme etc. A eventual retirada desses intermediários pode ser compensada por reações que permitem restabelecer o seu nível. Entre essas reações, chamadas *reações anapleróticas* (reações de preenchimento), a mais importante é a que leva à formação de oxaloacetato a partir do piruvato, catalisada pela *piruvato carboxilase*:



Piruvato — Oxaloacetato

O oxaloacetato, além de ser um intermediário do ciclo de Krebs, participa da gliconeogênese. No capítulo referente a esta via metabólica (Capítulo 14), a reação catalisada pela piruvato carboxilase será analisada com maiores detalhes.

A degradação de vários aminoácidos também produz intermediários do ciclo de Krebs, constituindo reações anapleróticas adicionais.

A atividade da piruvato carboxilase permite regular a velocidade do ciclo de Krebs

A regulação completa do ciclo de Krebs será descrita no Capítulo 20. Neste ponto, entretanto, é conveniente antecipar um aspecto importante desta regulação que permite entender a relação entre a glicólise e o próprio ciclo.

No ciclo de Krebs, o oxaloacetato tem um papel até certo ponto catalítico: como não é efetivamente consumido pelas reações do ciclo, já que é reposto pela última reação, teoricamente com apenas uma molécula de oxaloacetato poder-se-ia oxidar uma quantidade qualquer de acetil-CoA. Entretanto, a velocidade com que esta oxidação ocorreria seria muito baixa, uma vez que, após a condensação de acetil-CoA com oxaloacetato, iniciando o ciclo, novas moléculas de acetil-CoA só poderiam ser oxidadas quando, ao final das reações do ciclo, o oxaloacetato fosse regenerado. O ajuste da velocidade de consumo de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs à sua concentração é feito por intervenção da reação catalisada pela piruvato carboxilase. *Esta enzima é fortemente ativada pela própria acetil-CoA.* Desta forma, quando, por exemplo, a glicólise é intensa e grande quantidade de piruvato é transformada em acetil-CoA, o acúmulo deste composto ativa a piruvato carboxilase e o piruvato passa a originar oxaloacetato. Com concentrações concomitantemente altas de oxaloacetato e acetil-CoA, a reação catalisada pela citrato sintase, que dá início ao ciclo, pode funcionar a velocidades altas.

10.3 CICLO DO GLIOXILATO

O ciclo do glioxilato permite a síntese de glicose a partir de acetil-CoA

Nos vegetais, em leveduras e algumas bactérias, encontra-se uma via alternativa de metabolismo de acetil-CoA, chamada *ciclo do glioxilato* (Fig. 10.4), que permite a produção líquida de intermediários do ciclo a partir de acetil-CoA. Esta via conta com a participação de enzimas do ciclo de Krebs, além de duas enzimas ***ausentes de tecidos animais***: a *isocitrato liase* e a *malato sintase*. Por ação da isocitrato liase, o isocitrato é cindido em succinato e glioxilato; o glioxilato condensa-se com acetil-CoA, produzindo malato, na reação catalisada pela malato sintase. Estas duas enzimas localizam-se, nos vegetais, em organelas chamadas *glioxissomos*, um tipo especial de peroxissomos (Seção 16.2) que também efetuam a oxidação de ácidos graxos e dispõem, portanto, de uma fonte de acetil-CoA.

No ciclo de Krebs, isocitrato converte-se em succinato por reações que envolvem a perda de dois carbonos, sob a forma de CO_2. No ciclo do glioxilato, os seis carbonos do isocitrato originam succinato (C_4) e glioxilato (C_2). O glioxilato reage com outra molécula de acetil-CoA formando malato, que regenera oxaloacetato. *O ciclo do glioxilato consome, portanto, duas moléculas de acetil-CoA ($C_2 + C_2$) e produz uma molécula de succinato (C_4).* A equação geral do ciclo do glioxilato é:

$$2\ \text{Acetil-CoA} + NAD^+ + 2\ H_2O \longrightarrow \text{Succinato} + 2\ \text{HS-CoA} + NADH + 3\ H^+$$

A síntese líquida de succinato viabiliza a conversão dos carbonos da acetil-CoA a glicose: o succinato, por ação de enzimas do ciclo de Krebs e da gliconeogênese, produz glicose. Nos vegetais, esta síntese envolve a participação de diferentes compartimentos celulares e, conseqüentemente, o transporte de compostos através de membranas, mediado por permeases. No glioxissomo, acetil-CoA condensa-se com oxaloacetato formando citrato, que é isomerizado a isocitrato, por reações idênticas às do ciclo de Krebs; isocitrato é cindido em glioxilato e succinato. O glioxilato reage com acetil-CoA, originando malato, que regenera oxaloacetato por ação da malato desidrogenase mitocondrial. O succinato não pode ser utilizado pelo glioxissomo e, na mitocôndria, transforma-se em malato, graças às atuações da succinato desidrogenase e da fumarase do ciclo de Krebs. O malato, por ação da malato desidrogenase citossólica, origina oxaloacetato, que é convertido em glicose pelas reações da gliconeogênese.

O ciclo do glioxilato, dessa forma, permite obter glicose a partir de acetil-CoA e, portanto, de ácidos graxos. ***Esta é uma impossibilidade metabólica dos animais***, pois, no ciclo de Krebs, para cada molécula de acetil-CoA introduzida, são liberadas duas moléculas de CO_2, não havendo, assim, ganho líquido de carbonos para a formação de oxaloacetato.

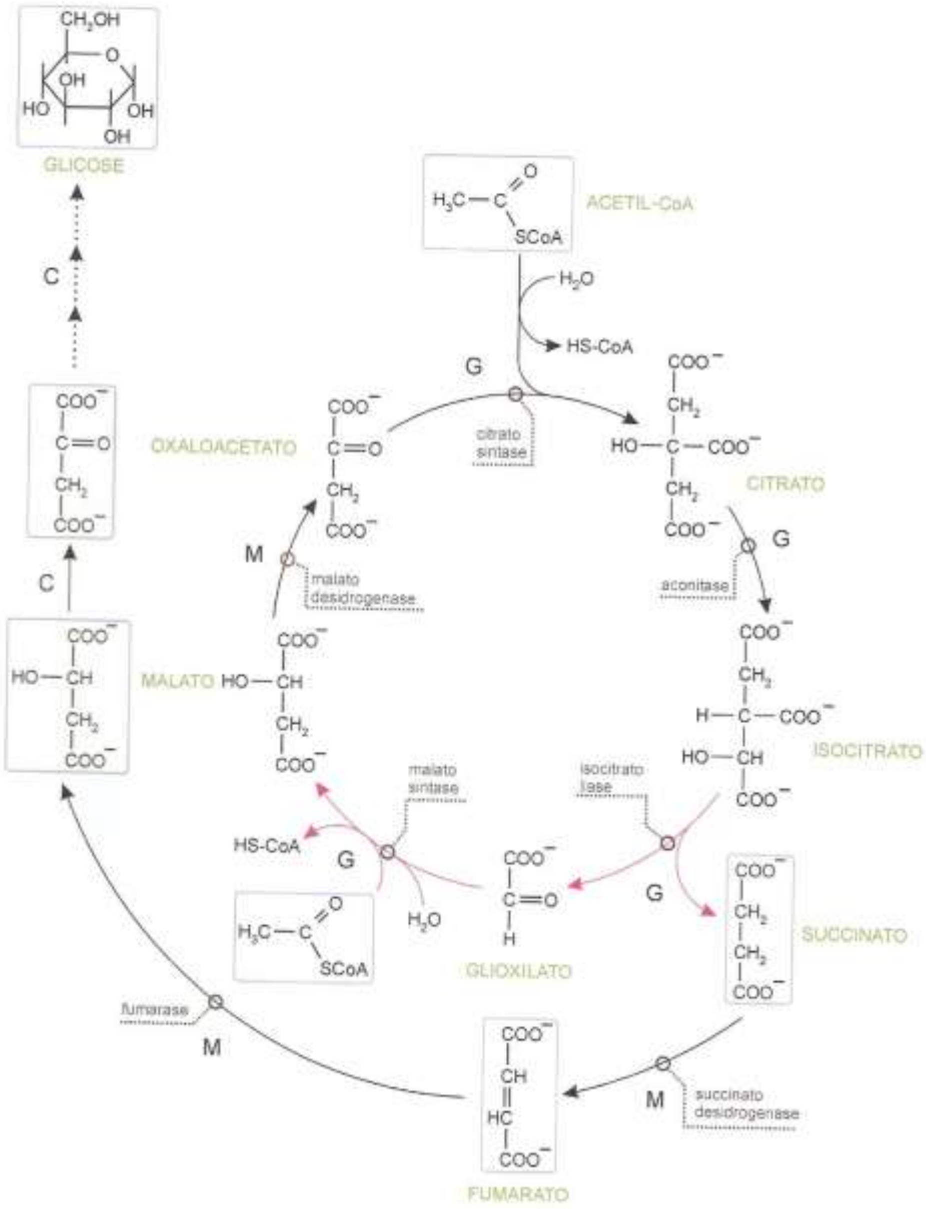


Fig. 10.4 Ciclo do glioxilato. As enzimas isocitrato liase e malato sintase (em vermelho), presentes em plantas e bactérias, permitem a síntese líquida de succinato a partir de acetil-CoA. O succinato é transportado para a mitocôndria, onde origina malato; no citossol, o malato é convertido a oxaloacetato, que pode originar glicose pela gliconeogênese (setas pontilhadas). Estão omitidas, das reações comuns ao ciclo de Krebs, as coenzimas participantes. G = Glioxissomo; M = Mitocôndria; C = Citossol.

O ciclo do glioxilato é particularmente ativo em sementes oleaginosas em germinação, para a transformação de suas reservas lipídicas em glicose, precursora da celulose. Este ciclo possibilita ainda, a certas bactérias, crescerem em meios contendo apenas ácidos graxos como fonte de carbonos.

BIBLIOGRAFIA

Bubber P et al: Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. Neurochem Int 45 (7):1021-8, 2004.

Eastmond PJ, Graham IA: Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci* **6**:72-77, 2001.

Hengeveld AF, de Kok A: Structural basis of the dysfunctioning of human 2-oxo acid dehydrogenase complexes. *Curr Med Chem* **9** (4):499-520, 2002.

Kornberg H: Krebs and his trinity of cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1** (3):225-8, 2000.

Krebs HA, Johnson WA: The role of citric acid in the intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**:148-156, 1937.

Lambeth DO: Reconsideration of the significance of substrate-level phosphorylation in the citric acid cycle. *Biochem Mol Biol Edu* **34** (1):21-29, 2006.

Lambeth DO et al: Expression of two succinyl-CoA synthetases with different nucleotide specificities in mammalian tissues. *J Biol Chem* **279** (35):36621-36624, 2004.

Patel MS, Korotchkina LG: The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Mol Biol Edu* **31**:5-15, 2003.

Penfield S et al: Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: Arabidopsis as a model system. *Biochem Soc Trans* **33**:380-383, 2005.

Scriver CR et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Velot C, Srere PA: Reversible transdominant inhibition of a metabolic pathway. In vivo evidence of interaction between two sequential tricarboxylic acid cycle enzymes in yeast. *J Biol Chem* **275** (17):12926-12933, 2000.

11

Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

11.1 OXIDAÇÃO DE COENZIMAS E SÍNTESE DE ATP

Os processos de oxidação da glicose, de aminoácidos e de ácidos graxos levam à produção de acetil-CoA que, no ciclo de Krebs, é totalmente oxidada a CO_2. O ciclo de Krebs constitui, portanto, o estágio final e máximo de oxidação dos átomos de carbono que compõem os carboidratos, proteínas e lipídios. A oxidação destes compostos é acompanhada da redução de grande quantidade das coenzimas NAD^+ e FAD. Para exemplificar, está apresentado a seguir o cômputo do número de mols destas coenzimas reduzidas durante a oxidação de um mol de glicose:

Etapa/Reação	Mols de NADH	Mols de $FADH_2$
Glicólise		
Gliceraldeído 3-fosfato → 1,3-Bisfosfoglicerato	2	–
Piruvato → Acetil-CoA	2	–
Ciclo de Krebs		
Isocitrato → α-Cetoglutarato	2	–
α-Cetoglutarato → Succinil-CoA	2	–
Succinato → Fumarato	–	2
Malato → Oxaloacetato	2	–
Total	10	2

Concomitantemente, há produção de 4 mols de ATP: 2 mols de saldo da glicólise e 2 mols produzidos como GTP no ciclo de Krebs. Do ponto de vista energético, verifica-se, então, que da energia total disponível na molécula de glicose, uma fração muito pequena levou à produção de ATP; a maior parte foi conservada nas coenzimas reduzidas. Este fenômeno repete-se na oxidação de aminoácidos e lipídios: há uma pequena síntese direta de ATP ao longo das reações de sua degradação, mas a maior parte da energia disponível é armazenada em coenzimas reduzidas. Estas coenzimas

devem ser reoxidadas por duas razões. Primeiramente, para que, voltando à forma oxidada, possam participar outra vez das vias de degradação dos nutrientes. Em segundo lugar, é a partir da oxidação destas coenzimas que a energia nelas conservada pode ser empregada pelas células para sintetizar ATP. As células aeróbias produzem a maior parte do seu ATP por oxidação das coenzimas pelo oxigênio (a chamada "respiração celular"), efetuada por uma *cadeia de transporte de elétrons* ("cadeia respiratória"), à qual está intimamente associada a *síntese de ATP*. Esta síntese consiste na fosforilação do ADP (ADP + $P_i \rightarrow$ ATP) e, por utilizar a energia derivada da oxidação das coenzimas, é denominada *fosforilação oxidativa*.

A oxidação de coenzimas libera grande quantidade de energia

Nos organismos aeróbios, a oxidação das coenzimas é feita por transferência de seus elétrons para o oxigênio; recebendo elétrons, o oxigênio liga-se a prótons do meio, formando água. Este processo libera grande quantidade de energia, em virtude da diferença de potenciais de redução (Capítulo 4) entre a coenzima reduzida e o oxigênio, como será visto pelo cálculo a seguir. O potencial de redução de NAD^+/NADH vale −0,32 V e o potencial de O_2/H_2O vale +0,82 V. Usando a expressão

$$\Delta G^{\circ\prime} = -n\mathcal{F}\,\Delta E^{\circ\prime}$$

pode-se calcular o valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para a transferência de 2 elétrons do NADH para o oxigênio:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -2 \times 96{,}5 \times [0{,}82 - (-0{,}32)]$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -220 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

O valor encontrado é bastante alto quando comparado ao valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ da síntese de ATP, 31 kJ · mol^{-1}. Em outras palavras, do ponto de vista meramente quantitativo, a energia liberada na oxidação de um mol de NADH permite a produção de alguns mols de ATP. A questão fundamental, entretanto, é: como aproveitar esta energia? Se a transferência de elétrons das coenzimas reduzidas fosse feita diretamente para o oxigênio, toda a energia do processo seria liberada como calor, portanto, inutilizável pelas células para promover os processos que requerem energia. Vale lembrar que a única forma de energia utilizável pelas células para tais processos é a energia química presente no ATP.

A estratégia adotada pelas células consiste em transformar a energia contida nas coenzimas reduzidas em um *gradiente de prótons* e utilizar este gradiente para promover a síntese de ATP. A energia para gerar o gradiente de prótons é conseguida pela transferência dos elétrons das coenzimas para o oxigênio, não diretamente, mas via passagens intermediárias por vários compostos, que constituem uma *cadeia de transporte de elétrons*. Para cumprir esta função, os compostos que formam a cadeia são organizados de acordo com seus potenciais de redução. Assim, os elétrons partem da coenzima reduzida, que tem potencial de redução menor que os componentes da cadeia, e percorrem uma seqüência de transportadores com potenciais de redução crescentes, até atingirem o oxigênio, que tem o maior potencial de redução. As transferências de elétrons entre estes compostos são sempre, portanto, acompanhadas de queda de energia livre (ver equação anterior). O transporte de elétrons é facilitado pelo fato de tais compostos estarem organizados em membranas, com posições definidas, de modo a situar cada componente exatamente entre aquele que lhe fornecerá elétrons e aquele ao qual seus elétrons serão doados. Ao mesmo tempo em que as passagens de elétrons se processam, forma-se um *gradiente de prótons*, ou seja, estabelece-se uma concentração de prótons diferente de cada lado da membrana onde ocorre o transporte de elétrons. *É o aproveitamento da energia potencial contida no gradiente de prótons que torna possível a síntese de ATP.*

11.2 CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS MITOCONDRIAL

Os transportadores de elétrons estão agrupados em 4 complexos

A oxidação das coenzimas reduzidas processa-se na membrana interna da mitocôndria, da qual fazem parte os componentes da cadeia de transporte de elétrons. A maioria destes componentes agrupa-se em quatro complexos, designados I, II, III e IV, que atravessam a membrana interna. Cada complexo é constituído por diversas subunidades proteicas associadas a grupos prostéticos diferentes: FMN, FAD, centros ferro-enxofre, grupos heme (presentes nos citocromos) e íons cobre. Estes componentes organizam-se em ordem crescente de potenciais de redução (Tabela 11.1). Sem fazer parte de complexos, aparecem ainda dois componentes móveis da cadeia de transporte de elétrons: a coenzima Q (CoQ), que conecta os Complexos I e II ao Complexo III, e o citocromo *c*, que conecta o Complexo III ao Complexo IV.

Tabela 11.1 Potenciais de redução padrão (E°') dos componentes da cadeia de transporte de elétrons

	Par oxidado/reduzido	E°' (volts)
	$NAD^+/NADH$	−0,32
Complexo I		
	$FMN/FMNH_2$	−0,30
	Centros Fe-S ox/red[1]	−0,38 a −0,27
	Fumarato/Succinato	+0,03
Complexo II		
	$FAD/FADH_2$	−0,04
	Centros Fe-S ox/red	−0,03 a +0,06
	Citocromo *b* ox/red	−0,08
	$CoQ/CoQH_2$	+0,05
Complexo III		
	Citocromo b_{566} ox/red[2]	−0,03
	Citocromo b_{562} ox/red	+0,03
	Centros Fe-S ox/red	+0,28
	Citocromo c_1 ox/red	+0,22
	Citocromo *c* ox/red	+0,24
Complexo IV		
	Citocromo *a* ox/red	+0,29
	Cu^{2+}/Cu^{1+}	+0,34
	Citocromo a_3 ox/red	+0,55
	O_2/H_2O	+0,82

[1] As formas oxidada e reduzida dos centros Fe-S e citocromos contêm Fe^{+3} e Fe^{+2}, respectivamente.
[2] Os citocromos b_{566} e b_{562} também são chamados de b_L e b_H, devido ao valor baixo (*Low*) e alto (*High*), respectivamente, de seus potenciais de redução.

A posição dos transportadores de elétrons na membrana interna da mitocôndria está esquematizada na Fig. 11.1. Dois elétrons do NADH são transferidos para o Complexo I, do Complexo I para CoQ, depois para o Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e finalmente para o oxigênio. Elétrons presentes no succinato e em outros substratos têm uma entrada especial na cadeia de transporte de elétrons: são transferidos ao Complexo II e deste para CoQ; deste ponto em diante, seguem o caminho comum: Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e oxigênio. Estas transferências são possíveis porque todos os compostos presentes nos complexos, mais a CoQ e o citocromo *c*, podem apresentar-se nos estados reduzido e oxidado — ao receberem um elétron do componente anterior da cadeia, reduzem-se; transferindo o elétron para o componente seguinte, oxidam-se e estão aptos a receber elétrons novamente.

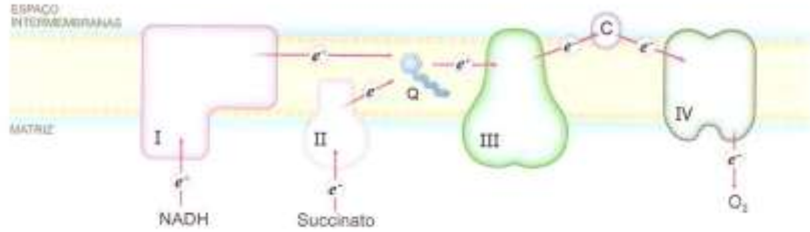


Fig. 11.1 Disposição dos Complexos I, II, III e IV, transportadores de elétrons, na membrana interna da mitocôndria (para maior clareza, o Complexo II foi deslocado de sua posição transmembrana). As setas indicam a trajetória dos elétrons provenientes do NADH ou do succinato até o oxigênio. C: citocromo *c*; Q: coenzima Q.

Em seguida será apresentada a natureza química dos transportadores de elétrons e, mais adiante, a sua organização nos Complexos I a IV. A estrutura tridimensional com grau de resolução atômica dos Complexos II, III e IV é conhecida, mas o exato caminho percorrido pelos elétrons não está completamente elucidado.

Os grupos prostéticos dos complexos atuam como centros de óxido-redução

A *flavina mononucleotídio (FMN)*, componente do Complexo I, é um derivado da vitamina riboflavina, com estrutura semelhante à do FAD (Seção 9.1), e, como este, capaz de receber 2 prótons e 2 elétrons, passando à forma totalmente reduzida, $FMNH_2$ (Fig. 11.2). A redução de FMN ocorre em duas etapas: ao receber 1 próton e 1 elétron, converte-se em uma *semiquinona*, um radical livre que, ao reagir com mais 1 próton e 1 elétron, origina $FMNH_2$. As proteínas que contêm uma coenzima derivada da riboflavina (FAD ou FMN) são designadas *flavoproteínas*.

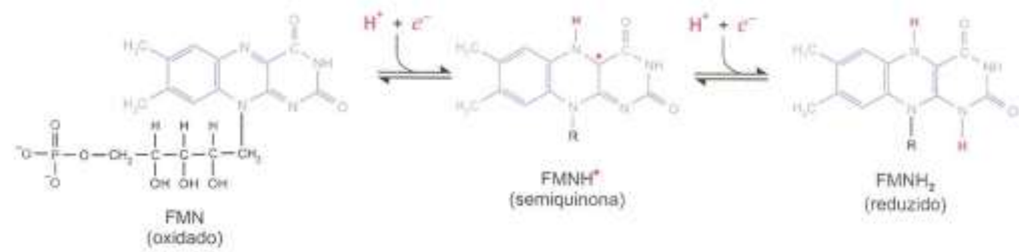


Fig. 11.2 Estruturas da flavina mononucleotídio. A forma oxidada (FMN) reage com um próton e um elétron, convertendo-se na forma semiquinona ($FMNH^{\bullet}$); a incorporação de mais um próton e um elétron resulta na forma totalmente reduzida ($FMNH_2$).

Os *centros ferro-enxofre* (*centros Fe-S*), presentes nos Complexos I, II e III, são formados de íons de ferro e de enxofre, podendo apresentar diversas configurações (Fe-S, Fe_2-S_2, Fe_4-S_4 etc.). Estão associados à cadeia polipeptídica por ligação a resíduos de cisteína, mais freqüentemente (Fig. 11.3). As proteínas que contêm centros desta natureza são chamadas *proteínas ferro-enxofre* (ou *proteínas com ferro não-hêmico*, para indicar que o íon de ferro não faz parte de um grupo heme). Os centros Fe-S *não* recebem prótons; são transportadores de elétrons unicamente, recebidos e doados pelo íon de ferro, cuja valência alterna entre Fe^{3+} e Fe^{2+}.

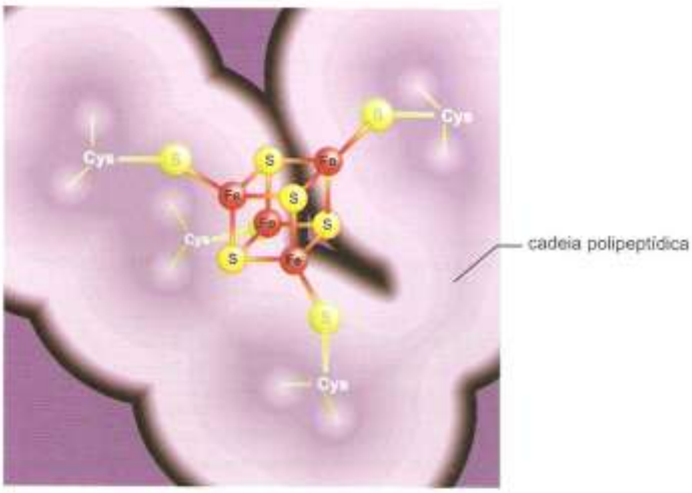


Fig. 11.3 Estrutura de um centro ferro-enxofre do tipo Fe_4-S_4. Os átomos de ferro estão ligados a átomos de enxofre e a resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica da proteína ferro-enxofre.

A *ubiquinona* ou *coenzima Q* (CoQ ou Q) representa uma família de quinonas que diferem pelo número de unidades isoprênicas presentes em sua cadeia lateral. A forma mais comum encontrada nos mamíferos apresenta 10 dessas unidades. As características hidrofóbicas da ubiquinona permitem sua mobilidade na fase lipídica da membrana, ao contrário dos outros componentes da cadeia de transporte de elétrons, que têm posições relativamente fixas na membrana mitocondrial, com exceção do citocromo *c*. A ubiquinona oxidada (Q) recebe 2 prótons e 2 elétrons, originando a forma reduzida, o ubiquinol (QH_2). A redução, como no caso do FMN, ocorre via uma forma intermediária, que é um radical livre, a semi-ubiquinona, $QH^{\bullet}$ (Fig. 11.4).

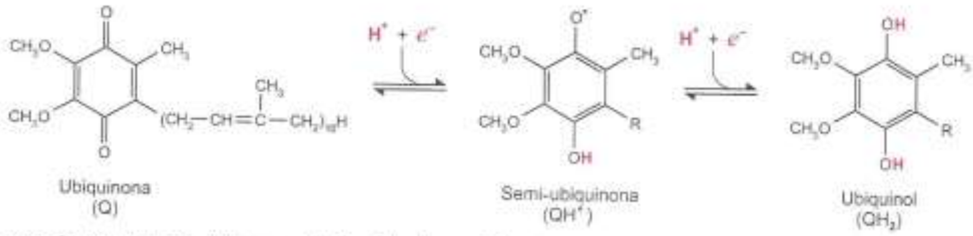


Fig. 11.4 Formas da coenzima Q. A forma oxidada, ubiquinona (Q), origina a semi-ubiquinona ($QH^{\bullet}$) ao receber um próton e um elétron; a reação com mais um próton e um elétron produz a forma reduzida, ubiquinol (QH_2).

Os *citocromos* são proteínas transportadoras de elétrons, que contêm heme (Seção 3.2) como grupo prostético. Em células de eucariotos, proteínas deste tipo fazem parte da membrana interna da mitocôndria, das membranas do retículo endoplasmático e da membrana tilacóide dos cloroplastos; em bactérias, localizam-se na membrana plasmática. Em todas essas membranas ocorre transporte de elétrons. O íon de ferro presente no grupo heme é responsável pela capacidade de transferência de elétrons destas proteínas: o íon pode alternar entre os estados de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+}.

Os citocromos são classificados em *a*, *b* e *c*, segundo o espectro de absorção que apresentam — os três tipos estão representados na cadeia de transporte de elétrons. Os subtipos de citocromos são caracterizados por um índice que indica, em nanômetros, o pico máximo de absorção; dois exemplos são o *citocromo* b_{562} e o *citocromo* b_{566} do Complexo III. Naturalmente, cada citocromo é constituído por uma cadeia polipeptídica com uma seqüência de aminoácidos que lhe é própria. Os citocromos diferem também quanto aos radicais substituintes do grupo heme e quanto à forma de ligação do heme à cadeia polipeptídica; esta ligação, nos tipos *a* e *b*, é não-covalente e, no tipo *c*, é covalente (tioéter), formada com resíduos de cisteína (Fig. 11.5).

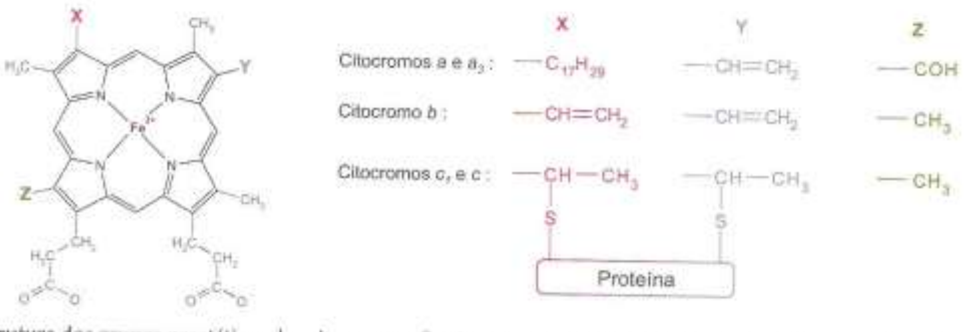


Fig. 11.5 Estrutura dos grupos prostéticos dos citocromos. Os citocromos dos tipos *a*, *b* e *c* apresentam o grupo heme caracterizado pelos substituintes X, Y, Z indicados na figura. Nos citocromos do tipo *c*, o grupo heme estabelece ligações tioéter com resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica; nos outros dois tipos, a ligação é não-covalente.

O citocromo *c*, ao contrário dos outros citocromos, que são proteínas integradas, é uma proteína periférica, situada na face externa da membrana interna da mitocôndria, com a qual estabelece ligações fracas; adicionalmente, é uma proteína relativamente pequena. Seu tamanho e mobilidade permitem-lhe cumprir sua função na cadeia de transporte de elétrons, qual seja, a de conectar o Complexo III, do qual recebe elétrons, ao Complexo IV, ao qual doa elétrons.

O Complexo I oxida o NADH, transferindo seus elétrons para a coenzima Q

O Complexo I, também chamado *NADH-ubiquinona óxido-redutase* (Fig. 11.6), é a primeira enzima da cadeia de transporte de elétrons de muitas bactérias e de mitocôndrias da maioria dos eucariotos. É um dos maiores complexos de membrana conhecidos, constando de 46 cadeias polipeptídicas em mitocôndrias de mamíferos. A estrutura atômica do Complexo I, ao contrário dos outros complexos da cadeia, ainda não foi desvendada; ao microscópio eletrônico, apresenta forma de L — um braço fica integrado na membrana e o outro, periférico, projeta-se na matriz mitocondrial (ou no citoplasma bacteriano). Às cadeias do braço periférico estão associados uma molécula de FMN e até 9 centros Fe-S. A falta de dados a respeito de sua estrutura extremamente complexa tem limitado o entendimento de seu mecanismo de ação.

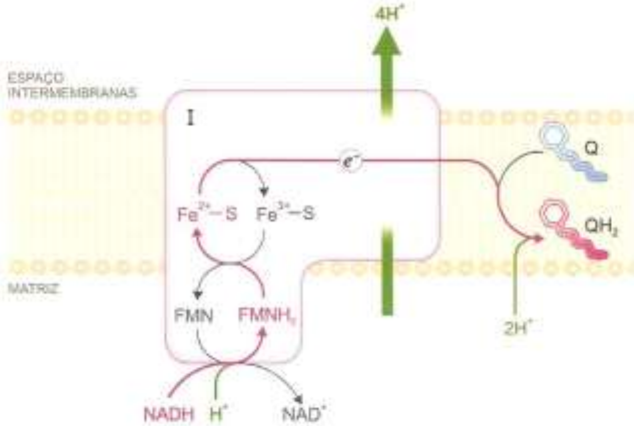


Fig. 11.6 Modelo simplificado das transferências de elétrons através do Complexo I. As setas vermelhas indicam o caminho que percorrem: são doados do NADH ao FMN e, deste, a centros Fe-S (apenas um está representado) para então serem transferidos à coenzima Q. As setas verdes indicam movimentação de prótons, retirados da matriz (setas finas) ou bombeados para fora da mitocôndria (seta grossa).

O doador de elétrons para a redução de FMN, que constitui a primeira transferência de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, é o NADH produzido por várias reações do metabolismo. São exemplos de reações produtoras de NADH as reações de oxidação de gliceraldeído 3-fosfato (glicólise), piruvato (conversão piruvato → acetil-CoA), isocitrato, α-cetoglutarato e malato (ciclo de Krebs) e β-hidroxiacil-CoA (ciclo de Lynen), todas catalisadas por desidrogenases. A reação processada é:

$$\text{NADH} + H^+ + \underset{\text{(Complexo I)}}{\text{FMN}} \longrightarrow NAD^+ + \underset{\text{(Complexo I)}}{FMNH_2}$$

O resultado desta etapa é, portanto, a oxidação do NADH e a entrada dos elétrons na membrana interna da mitocôndria, de onde só sairão para serem doados ao oxigênio, no final da cadeia. Note-se que a redução de FMN implica a retirada de um próton da matriz.

Continuando seu percurso, os elétrons do $FMNH_2$ são transferidos para uma seqüência de centros Fe-S; depois destas passagens, são entregues à coenzima Q, deixando o Complexo I. Novamente, são consumidos prótons da matriz para converter CoQ em $CoQH_2$.

Neste ponto, deve ser mencionado, novamente, um fenômeno essencial do transporte de elétrons, que é a movimentação concomitante de prótons (discutida na Seção 11.3). Nas etapas da cadeia catalisadas pelos Complexos I e III, esta movimentação parece ser resultante da disposição alternada de transportadores de elétrons *e* prótons (FMN, CoQ) e transportadores *apenas* de elétrons, que não aceitam prótons (centros Fe-S, grupos heme). No caso do Complexo I, no processo de transferência de elétrons do $FMNH_2$ para os centros Fe-S, os prótons são excluídos, sendo deslocados da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranas. Observa-se aqui, então, a primeira etapa da forma-

ção do gradiente de prótons: da matriz mitocondrial são retirados prótons; no espaço intermembranas são introduzidos prótons. Admite-se atualmente que sejam excluídos 4 prótons para cada NADH oxidado.

Em resumo, o Complexo I catalisa a transferência de elétrons do NADH à ubiquinona e a translocação concomitante de prótons através da membrana. Ou seja, o Complexo I, além de conter os centros de óxido-redução mencionados, atua como uma bomba de prótons, movida pelas reações redox; o acoplamento dos dois processos ainda não é compreendido.

O Complexo II oxida o succinato, transferindo seus elétrons também para a coenzima Q

A succinato desidrogenase, também denominada Complexo II ou *succinato-ubiquinona óxido-redutase* (Fig. 11.7), é um componente tanto do ciclo de Krebs, quanto da cadeia de transporte de elétrons. A enzima acopla a oxidação do succinato a fumarato na matriz mitocondrial, com a redução da coenzima Q na membrana interna da mitocôndria; representa um segundo ponto de entrada de elétrons na cadeia, em direção ao oxigênio.

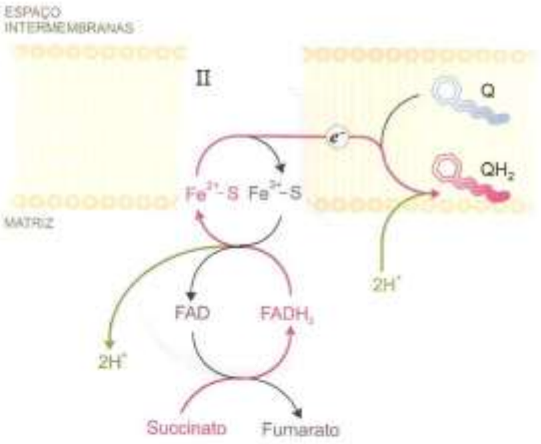


Fig. 11.7 A succinato desidrogenase (Complexo II), que também participa do ciclo de Krebs, catalisa a oxidação do succinato por transferência dos elétrons (setas vermelhas) ao grupo prostético, FAD; a seguir são captados por centros Fe-S (a figura mostra um dos centros) e passados para a coenzima Q. O Complexo II não catalisa a extrusão de prótons.

A succinato desidrogenase, em diversos organismos, é constituída por uma porção esférica, que se projeta para a matriz mitocondrial (para o citoplasma, em bactérias), ligada a um pedúnculo, imerso na membrana. O domínio hidrofílico consta de uma flavoproteína (FAD), que contém o sítio de ligação ao substrato, e de uma proteína ferro-enxofre (três centros Fe-S); a porção hidrofóbica é formada por um citocromo do tipo *b* e uma outra subunidade que apresenta o sítio de ligação com a coenzima Q. Os elétrons e os prótons do succinato são transferidos para o FAD, que se reduz a $FADH_2$; os elétrons do $FADH_2$ passam pelos centros Fe-S e, finalmente, são doados à CoQ. Como os centros Fe-S não recebem prótons, os prótons presentes no $FADH_2$ são devolvidos à matriz mitocondrial. O citocromo *b* não participa da transferência de elétrons, e sua função permanece desconhecida.

O Complexo II *não* contribui para a formação do gradiente de prótons, porque o valor de $\Delta E^{\circ\prime}$ e, conseqüentemente, o valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para a transferência de elétrons do succinato à coenzima Q são muito pequenos para promover o bombeamento de prótons para fora da mitocôndria.

A coenzima Q é o ponto de convergência de elétrons provenientes de NADH (Complexo I), succinato (Complexo II), glicerol 3-fosfato e acil-CoA

A coenzima Q, como foi visto, recebe os elétrons provenientes dos Complexos I e II. Adicionalmente, existem outras vias de transferência de elétrons que convergem para a CoQ. Nestas vias, o substrato é oxidado por uma desidrogenase (uma flavoproteína), com redução de FAD a $FADH_2$; os elétrons, depois de passarem por compostos intermediários, são entregues à CoQ. Exemplos deste tipo de substrato são encontrados no metabolismo de triacilgliceróis (Capítulo 16). Um deles, o glicerol 3-fostato, origina diidroxiacetona fosfato, por ação da *glicerol 3-fosfato desidrogenase*, localizada na face externa da membrana interna da mitocôndria. Neste caso, os elétrons do substrato passam diretamente

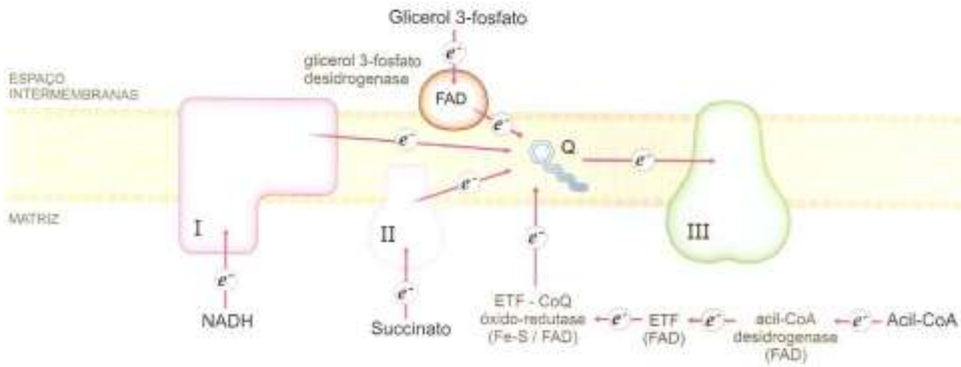


Fig. 11.8 A coenzima Q é o ponto de convergência dos elétrons provenientes do NADH (via Complexo I), do succinato (via Complexo II), do glicerol 3-fosfato e de acil-CoA. ETF: flavoproteína transferidora de elétrons.

do FAD para a coenzima Q. Uma outra via que reduz CoQ inicia-se com a oxidação de acil-CoA (primeira reação da β-oxidação de ácidos graxos), catalisada pela *acil-CoA desidrogenase*, cuja coenzima, FAD, é reduzida. Os elétrons do $FADH_2$ são transferidos pela *ETF* (da denominação inglesa para *flavoproteína transferidora de elétrons*) para uma outra flavoproteína, que também contém um centro Fe-S, a *ETF-ubiquinona óxido-redutase*, que, finalmente, doa o par de elétrons para CoQ (Fig. 11.8).

Os elétrons das diferentes procedências descritas percorrem, a partir da coenzima Q, um caminho comum até o oxigênio.

O Complexo III transfere elétrons da Coenzima Q para o citocromo *c*

O Complexo III, ou *citocromo* bc_1 ou *ubiquinona-citocromo c óxido-redutase*, catalisa a transferência de elétrons da ubiquinona ao citocromo *c*, acompanhada de movimentação de prótons. A enzima de mitocôndrias de mamíferos é formada pela associação de dois monômeros, cada um com 11 subunidades, que incluem os citocromos b_{562} e b_{566}, uma proteína Fe-S e o citocromo c_1.

O acoplamento do transporte de elétrons à translocação de prótons pelo Complexo III é explicado pelo chamado *ciclo Q* (Fig. 11.9). De acordo com esta hipótese, a enzima apresenta dois sítios catalíticos distintos: um para a oxidação de QH_2, próximo à superfície externa da membrana, do qual faz parte o citocromo b_{566}, de menor potencial de redução (Tabela 11.1), e outro para a redução de Q, no lado interno da membrana, que contém o citocromo b_{562}, com maior potencial de redução. Quando QH_2 é oxidada, dois prótons são liberados no espaço intermembranas (o centro Fe-S e os citocromos recebem apenas elétrons) e quando Q é reduzida, são retirados da matriz. Na reação de oxidação de QH_2, seus elétrons seguem um caminho bifurcado: um elétron é transferido ao centro Fe-S, deste para o citocromo c_1 e para o citocromo *c*; o segundo elétron é passado, via os citocromos *b*, para a ubiquinona (Q). A semi-ubiquinona ($QH^{\bullet}$) resultante será totalmente reduzida a QH_2 depois que uma segunda molécula de QH_2 for oxidada.

Para melhor entendimento, o ciclo Q pode ser desmembrado em duas etapas. Na primeira etapa (Fig. 11.9 a), QH_2 perde 1 elétron e 1 próton, formando $QH^{\bullet}$: o elétron segue a rota $QH_2 \rightarrow$ Fe-S $\rightarrow c_1 \rightarrow c$ e o H^+ é liberado no espaço intermembranas. A semi-ubiquinona converte-se na forma oxidada, Q, por transferência de seu elétron aos citocromos *b* e por extrusão do próton. Q migra para o sítio catalítico interno (seta pontilhada), onde recebe, de volta, o elétron do citocromo b_{562} e reage com um H^+ da matriz, reconstituindo $QH^{\bullet}$. A transferência de um dos elétrons de QH_2 para o citocromo *c* resulta, portanto, na extrusão de 2 H^+ e no consumo de um H^+ da matriz para formar $QH^{\bullet}$, no sítio catalítico interno.

Na segunda etapa (Fig. 11.9 b), outra molécula de QH_2 percorre a mesma seqüência de reações que na primeira etapa, até a passagem do elétron para os citocromos *b* e formação de Q, que deixa o Complexo III e retorna à bicamada lipídica (seta pontilhada). Na presente etapa, esse elétron é doado do citocromo b_{562} para a semi-ubiquinona formada na etapa anterior ($QH^{\bullet}$), e, à custa de um H^+ do interior da mitocôndria, regenera QH_2. A redução da segunda molécula de citocromo *c* promove a extrusão de mais 2 H^+, o consumo de um outro H^+ da matriz, a regeneração da molécula de QH_2 consumida e a produção da forma oxidada, Q, que se torna disponível para receber elétrons dos componentes da cadeia que a antecedem (Complexo I, II etc.).

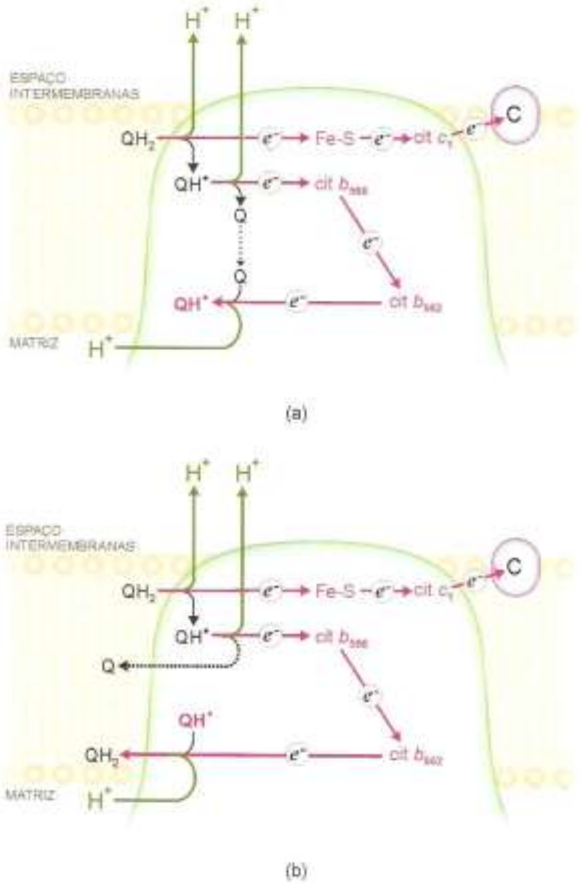


Fig. 11.9 Transporte de elétrons da coenzima Q para o citocromo *c*, catalisado pelo Complexo III: o ciclo Q. Os elétrons de QH_2 são transferidos, um de cada vez, em duas etapas. (a) Primeira etapa: $QH_2 \rightarrow QH^{\bullet}$. (b) Segunda etapa: $QH_2 \rightarrow Q$ e $QH^{\bullet} \rightarrow QH_2$, o que equivale a $QH^{\bullet} \rightarrow Q$. As setas pontilhadas indicam os deslocamentos da forma Q: em (a), do sítio catalítico mais externo para o sítio mais interno e em (b), do interior do Complexo III para a bicamada lipídica. Dois prótons são consumidos da matriz e quatro bombeados para o espaço intermembranas (setas verdes).

O ciclo Q pode ser assim resumido:

Primeira etapa	Segunda etapa
$QH_2 \rightarrow QH^{\bullet}$	$QH_2 \rightarrow Q$ $QH^{\bullet} \rightarrow QH_2$
cit *c* $(Fe^{3+}) \rightarrow$ cit *c* (Fe^{2+})	cit *c* $(Fe^{3+}) \rightarrow$ cit *c* (Fe^{2+})
1 H^+ matriz $\rightarrow$ 2 H^+ exterior	1 H^+ matriz $\rightarrow$ 2 H^+ exterior

Final: QH_2 + 2 cit *c* (Fe^{3+}) + 2 H^+ matriz $\rightarrow$ Q + 2 cit *c* (Fe^{2+}) + 4 H^+ exterior

Deste modo, o Complexo III, ao oxidar a coenzima Q e reduzir o citocromo *c*, promove a retirada de dois prótons da matriz e o bombeamento de quatro prótons para o exterior da mitocôndria.

O Complexo IV transfere elétrons para o oxigênio

O Complexo IV, ou *citocromo c oxidase*, é a última enzima das cadeias de transporte de elétrons bacterianas e mitocondriais; catalisa a passagem de elétrons do citocromo *c* para o oxigênio, formando água, acoplada ao bombeamento de prótons. Em mitocôndrias de eucariotos, constitui um dímero, sendo que cada monômero contém 13 subunidades proteicas associadas a dois grupos heme, do tipo *a* e a_3, e três íons de cobre. Estes íons, que alternam entre os estados de oxidação Cu^{2+} e Cu^{1+}, organizam-se em dois centros denominados Cu_A/Cu_A (com dois íons de cobre) e Cu_B (um íon de cobre). O heme a_3 e o centro Cu_B são extremamente próximos e formam o centro ativo onde o oxigênio é reduzido a água.

O Complexo IV (Fig. 11.10) catalisa a redução de uma molécula de oxigênio (O_2), que recebe quatro elétrons e liga-se a prótons da matriz convertendo-se em 2 H_2O, e a oxidação concomitante de quatro moléculas de citocromo *c* reduzido:

$$4 \text{ cit } c^{2+} + 4H^+ + O_2 \longrightarrow 4 \text{ cit } c^{3+} + 2\, H_2O$$

Acredita-se que esta reação envolva quatro transferências consecutivas de um elétron do citocromo *c* reduzido para o centro Cu_A/Cu_A, depois para o heme *a*, heme a_3, centro Cu_B e O_2. O mecanismo da redução permanece indeterminado. O Complexo IV, além de retirar prótons da matriz mitocondrial para reduzir o oxigênio, bombeia prótons adicionais (talvez quatro) para o espaço intermembranas, contribuindo para o gradiente de prótons. O mecanismo de funcionamento da enzima como uma bomba de prótons movida por reações de óxido-redução ainda é hipotético.

A utilização de oxigênio pelo Complexo IV responde por cerca de 95% de todo o oxigênio consumido pelo organismo humano; a produção de H_2O neste processo chega a cerca de 300 mL diários e é, muitas vezes, referida como *água metabólica*. Em determinadas espécies, esta produção de água é fundamental para a sobrevivência, como nos casos de animais que hibernam ou de camelos, que passam longos períodos sem ingerir água.

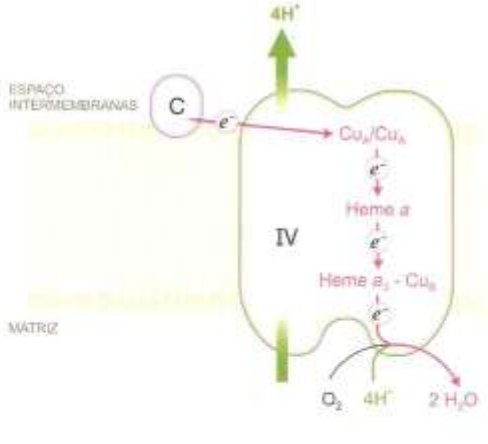


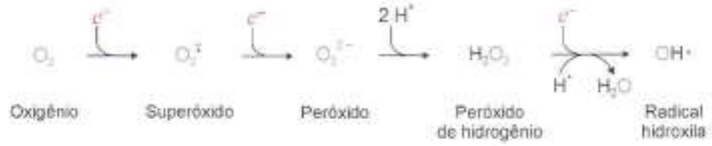
Fig. 11.10 Complexo IV. O caminho percorrido pelos elétrons neste complexo ainda é hipotético. Quatro elétrons provenientes do citocromo *c* seriam recebidos pelo centro Cu_A/Cu_A (contendo dois íons cobre), em seguida transferidos para o heme *a* e depois para o centro catalítico formado pela associação do heme a_3 ao centro Cu_B (um íon cobre), onde, finalmente, seriam doados ao oxigênio. Este combina-se com prótons da matriz (seta verde fina), reduzindo-se a água. O Complexo IV bombeia prótons para o exterior da mitocôndria (seta verde larga).

A redução parcial do oxigênio gera radicais livres

A transferência de quatro elétrons (e quatro prótons) ao oxigênio produz água. Todavia, a redução parcial do oxigênio, por adição de um elétron de cada vez, gera *radicais livres*[1], que podem causar dano severo às células. Alguns exemplos são o *ânion superóxido* e o *radical hidroxila*. A adição de um elétron ao oxigênio molecular (ver esquema a seguir) origina o íon superóxido, que reage com um elétron e gera o íon peróxido; este protona-se rapidamente, originando

[1] *Radical livre* é uma espécie química capaz de existência independente e que contém um ou mais elétrons não-pareados na orbital externa. Essas espécies, em geral, são extremamente instáveis e altamente reativas; ao reagirem com uma molécula, geram outro radical livre, iniciando uma reação em cadeia. Sua fórmula química é acompanhada de um ponto, representando o elétron não-pareado.

o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é um oxidante potente e, embora não seja um radical livre, pode originar o radical hidroxila, um dos radicais mais reativos.



O íon superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila são chamados, conjuntamente, de *espécies reativas de oxigênio* (*ROS*, da denominação inglesa).

A redução do oxigênio a água, catalisada pela citocromo *c* oxidase, apesar de envolver transferências de *um* elétron, ocorre sem que haja liberação de formas parcialmente reduzidas de oxigênio — os intermediários da reação permanecem firmemente ligados ao centro ativo da enzima, até que a água seja produzida. Por outro lado, há fortes evidências de que haja produção de radical superóxido nos Complexos I e III (e, talvez, no Complexo II), por reação da forma semiquinona da coenzima Q ou do FMN com oxigênio. Este processo seria intensificado quando o gradiente eletroquímico torna-se elevado, por falta de ADP (Seção 11.4): a inibição resultante da cadeia de transporte de elétrons acarretaria um aumento da meia-vida de intermediários com elétrons não-pareados, capazes de reduzir O_2 a $O_2^{\bar{\cdot}}$. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a maior fonte endógena de espécies reativas de oxigênio.

A formação de espécies reativas de oxigênio acontece ainda nos peroxissomos, no retículo endoplasmático e nas células do sistema imunológico; neste último caso, os radicais livres desempenham função essencial, qual seja, combater infecções bacterianas. Fatores externos ao organismo, como radiação cósmica e poluição ambiental, também podem levar à produção de radicais livres.

As espécies reativas de oxigênio reagem com proteínas e DNA, alterando suas estruturas, e com lipídios, convertendo-os a peróxidos. A peroxidação de lipídios resulta da reação de radicais livres com duplas ligações de moléculas de ácidos graxos componentes de membranas, as quais têm sua organização rompida, causando lise celular. Ainda mais, os peróxidos de lipídios geram outros radicais livres, amplificando o dano a macromoléculas.

As células dispõem de sistemas enzimáticos para a dissipação de radicais livres. A ação conjunta da *superóxido dismutase* (1) e da *catalase* (2), por exemplo, converte superóxido em água:

$$2\,O_2^{\bar{\cdot}} + 2\,H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (1)$$

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H_2O \qquad (2)$$

Outra enzima que catalisa a redução de H_2O_2 e de peróxidos de lipídios é a *glutationa peroxidase*, descrita no Capítulo 12 (Seção 12.3).

Além de enzimas, os seres humanos contam com a proteção de antioxidantes de baixa massa molar, como as *vitaminas A, C, E* e os *carotenóides*. Em doses elevadas, entretanto, a vitamina C atua como pró-oxidante. Os conhecimentos atuais não permitem recomendar suplementação desses antioxidantes.

Em condições normais do metabolismo celular, os mecanismos de defesa contra radicais livres permitem homeostase. Mas, quando há um aumento na produção dessas espécies, a capacidade protetora das enzimas e dos antioxidantes é ultrapassada, resultando em estresse oxidativo.

Como as espécies reativas de oxigênio reagem indiscriminadamente com uma grande variedade de componentes celulares e causam danos cumulativos, elas têm sido implicadas na etiologia do envelhecimento, de doenças neurodegenerativas (doenças de Parkinson e de Alzheimer), de câncer etc.

11.3 FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Os componentes da cadeia de transporte de elétrons apresentam-se organizados em ordem crescente de potenciais de redução, desde as coenzimas reduzidas até o oxigênio (ver Tabela 11.1). Desta forma, as transferências de elétrons de um componente para o seguinte constituem reações de óxido-redução termodinamicamente favoráveis. A síntese de ATP ou *fosforilação oxidativa* (de "*fosforilação* de ADP à custa da *oxidação* de coenzimas"), que é endergônica, utiliza a energia liberada por essas reações de óxido-redução. O mecanismo do acoplamento dos dois processos, investigado há cinco décadas, continua inconcluso.

A energia derivada do transporte de elétrons é convertida em uma força próton-motriz

O acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons pode ser explicado pela *hipótese quimiosmótica*, proposta por Mitchell em 1961. Segundo esta hipótese, a energia do transporte de elétrons é utilizada para bombear prótons através da membrana interna, que é virtualmente impermeável a prótons, para o exterior da mitocôndria (Fig. 11.11). O transporte de H^+ ocorre contragradiente, sendo, então, um processo endergônico. A movimentação unidirecional é possível por estar acoplada à transferência exergônica de elétrons e graças à disposição assimétrica dos componentes da cadeia de transporte de elétrons em relação às duas faces da membrana interna — esta proposição tem sido considerada desde o início deste capítulo.

A conseqüência do bombeamento é a produção de um *gradiente de prótons*, isto é, uma concentração diferente de prótons dentro e fora da mitocôndria. Em mitocôndrias isoladas consumindo O_2 ativamente, o pH externo chega a ser uma unidade menor do que o pH da matriz. A face da membrana interna voltada para a matriz fica mais negativa do que a face voltada para o espaço intermembranas, e a diferença de carga elétrica (*gradiente elétrico*) gera um potencial de membrana da ordem de 0,1 a 0,2 V. A energia conservada nesse *gradiente eletroquímico* é chamada de *força próton-motriz* e é constituída, portanto, de dois componentes: o gradiente de pH (concentração de prótons maior no espaço intermembranas) e o gradiente elétrico (a matriz é negativa em relação ao espaço intermembranas).

O retorno dos prótons ao interior da mitocôndria é um processo espontâneo, a favor do gradiente eletroquímico, que libera energia capaz de levar à síntese de ATP. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a prótons em toda a sua extensão, *exceto* em sítios específicos, constituídos pelo complexo sintetizador de ATP, a *ATP sintase* (Fig. 11.11) — é somente por este canal que os prótons podem atravessar a membrana, de volta à matriz, e desfazer o gradiente. A ATP sintase catalisa a formação de ATP quando os prótons atravessam a enzima, em direção ao interior da mitocôndria.

A variação de energia livre associada ao transporte de um próton através da membrana interna da mitocôndria pode ser determinada a partir da diferença de pH e do potencial de membrana estabelecidos em mitocôndrias consumindo oxigênio; tais medidas indicam um valor próximo de 20 $kJ \cdot mol^{-1}$. Considerando-se que cerca de 50 $kJ \cdot mol^{-1}$ são consumidos para a síntese de ATP nas condições intracelulares, teoricamente seria necessária a passagem de três prótons pela ATP sintase para cada ATP sintetizado; todavia, os resultados disponíveis indicam quatro prótons.

A teoria quimiosmótica vem sendo consubstanciada por evidências experimentais, algumas das quais são aqui apresentadas. A fosforilação oxidativa só se processa em mitocôndrias intactas ou em vesículas fechadas, compatíveis com a formação de um gradiente de prótons. Medidas de concentração de prótons durante o transporte de elétrons revelam acúmulo de prótons no exterior da mitocôndria ou no interior de vesículas invertidas. A síntese de ATP pode ser obtida mesmo na ausência de transporte de elétrons, desde que exista o gradiente de prótons. Esta verificação é feita pelo uso de vesículas invertidas. Quando se adiciona álcali ao meio de suspensão destas vesículas, a concentração de H^+ diminui subitamente;

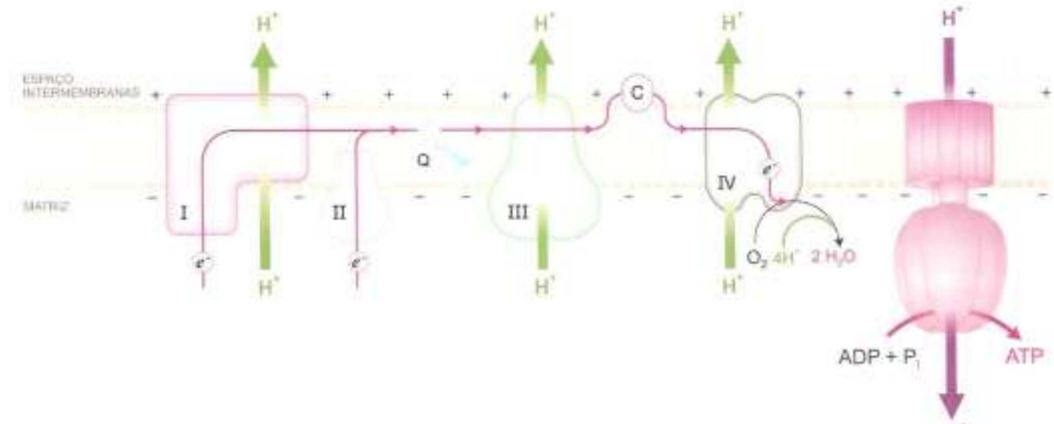


Fig. 11.11 Esquema mostrando o bombeamento de prótons (setas verdes) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas pelos Complexos I, III e IV, à custa da energia derivada do transporte de elétrons (setas vermelhas). O gradiente de prótons (concentração maior de H^+ fora da mitocôndria) e o gradiente elétrico (face interna da membrana interna mais negativa) constituem a força próton-motriz que é utilizada para sintetizar ATP pela ATP sintase, a única via de acesso de prótons para a matriz (seta roxa).

como a concentração interna de H^+ permanece constante, é gerado momentaneamente um gradiente de prótons. Há extrusão de prótons pela ATP sintase, acompanhada de síntese de ATP no exterior das vesículas.

É importante assinalar que, apesar dos progressos obtidos nesta área, ainda não estão perfeitamente esclarecidos pontos fundamentais da fosforilação oxidativa.

Duas hipóteses tentam explicar o mecanismo do bombeamento de prótons

A translocação de prótons através da membrana interna da mitocôndria é feita pelos Complexos I, III e IV. Este fato pôde ser verificado experimentalmente pela utilização de lipossomos (Capítulo 7), aos quais foram incorporados isoladamente cada um desses complexos. Nestes experimentos foi possível demonstrar que transferências de elétrons envolvendo cada um desses complexos são acompanhadas de deslocamento de prótons através da membrana das vesículas e que, portanto, são esses complexos as bombas de prótons geradoras do gradiente. Entretanto, o exato mecanismo do bombeamento de prótons ainda é objeto de controvérsia.

Um dos modelos existentes, do *acoplamento direto*, propõe que os transportadores de elétrons são diretamente envolvidos na translocação de prótons: alguns transportadores de elétrons, ao serem reduzidos, captam prótons da matriz mitocondrial e, ao transferirem elétrons para o componente seguinte da cadeia, liberam prótons no espaço intermembranas. Ou seja, a bomba de prótons e o centro de óxido-redução constituem uma entidade única, cujo estado de óxido-redução induz protonação ou desprotonação. Esta possibilidade é consistente com o bombeamento de prótons pelos Complexos I e III, como já apontado neste texto. Em contrapartida, parece pouco apropriado para o Complexo IV, que não dispõe de componentes que apresentem prótons no estado reduzido (o Complexo IV é formado de citocromos e íons cobre, transportadores apenas de elétrons).

Outra hipótese explicativa postula o *acoplamento indireto*, segundo o qual o centro redox e o módulo que bombeia prótons são distintos e distantes um do outro. A transdução de energia ocorre via mudanças conformacionais: os complexos transportadores de elétrons assumem configurações diferentes nos estados oxidado e reduzido. Ao ligar-se a elétrons, a proteína transportadora sofreria alterações estruturais que provocariam redução do valor de pK_a de grupos ionizáveis de seus aminoácidos (fenômeno análogo às alterações de pK_a de cadeias laterais de aminoácidos da hemoglobina decorrentes das mudanças estruturais desencadeadas por sua ligação com oxigênio — efeito Bohr, Capítulo 3) e também mudança na localização destes grupos. Assim, quando expostas na face interna da membrana, as cadeias laterais se ligam a prótons; após a transferência de elétrons, há uma diminuição do valor de seus pK_a e as cadeias laterais passam a ficar expostas na face externa da membrana, liberando prótons para o espaço intermembranas. Exemplos deste tipo de bomba de prótons já estão descritos para o Complexo IV de alguns organismos.

Os dois modelos propostos pressupõem a existência de canais para a migração de prótons na estrutura dos complexos que atuam como bombas de prótons. Estes canais seriam formados por cadeias laterais de aminoácidos hidrofílicos, além de moléculas de água associadas por pontes de hidrogênio, em uma disposição espacial adequada. Tais estruturas proporcionariam um movimento direcionado de prótons, ao serem transferidos ao longo dos resíduos de aminoácidos.

A variação de energia livre associada à transferência de elétrons através de cada um dos três complexos corresponde a uma força próton-motriz suficientemente grande para promover a síntese de ATP (Fig. 11.12). Para cada NADH que se oxida, ou seja, para cada par de elétrons transportados pelos Complexos I, III e IV, há síntese de 3 ATP. Pode-se chegar a esta mesma conclusão medindo-se o número de moléculas de ATP formadas e o número de átomos de oxigênio consumidos na oxidação de diferentes substratos; o quociente entre estes valores é chamado *razão P/O* — entre fosfato (*phosphate*, em inglês) incorporado em ATP e *oxigênio* utilizado. A razão P/O é uma medida da eficiência da fosforilação oxidativa. Quando o substrato é o NADH, cujos elétrons passam pelos três complexos enzimáticos até chegarem ao oxigênio, a razão P/O é 3; no caso do succinato, os elétrons são transferidos para o FAD e, a seguir, para a coenzima Q; como o complexo I é "saltado", o gradiente de prótons formado é menor e a razão P/O do succinato é 2. As equações respectivas de oxidação são as seguintes:

$$NADH + H^+ + 1/2\,O_2 + 3\,ADP + 3\,P_i + 3H^+ \longrightarrow NAD^+ + 3\,ATP + 4\,H_2O$$

$$FADH_2 + 1/2\,O_2 + 2\,ADP + 2\,P_i + 2H^+ \longrightarrow FAD + 2\,ATP + 3\,H_2O$$

Na verdade, os valores da razão P/O para NADH (3) e succinato (2), aceitos durante muito tempo, têm sido revistos. Diversos trabalhos indicam números menores, em torno de 2,5 e 1,5, respectivamente. Como a questão ainda está longe de ser esclarecida e como os valores de produção de ATP servem principalmente para comparações, neste texto serão adotados sempre os primeiros dados.

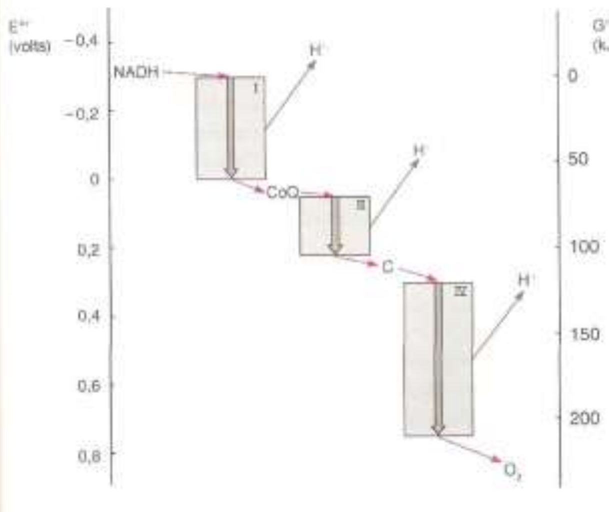


Fig. 11.12 Diagrama mostrando o potencial de redução padrão (E°') dos transportadores de elétrons. A variação de energia livre padrão (ΔG°') associada ao transporte dos elétrons do NADH ao oxigênio pode ser calculada a partir da ordenada à direita (G°'). Nas etapas de que participam os Complexos I, III e IV, o decréscimo de energia livre (setas largas) é suficiente para gerar um gradiente de prótons capaz de promover a síntese de ATP.

A ATP sintase é formada por dois componentes, F_1 e F_O

Em micrografias eletrônicas, pode-se observar que a face interna da membrana interna da mitocôndria é recoberta por microesferas, ligadas à membrana por pequenas hastes. O tratamento de preparações de mitocôndrias com ultra-som produz fragmentos de membrana que formam, espontaneamente, *vesículas invertidas*, nas quais a face com as microesferas situa-se do lado de fora (Fig. 11.13). Estas vesículas são capazes de efetuar o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa. Se as microesferas forem removidas das vesículas, estas conservam apenas a capacidade de transportar elétrons. Por outro lado, as microesferas isoladas contêm a atividade catalítica de síntese que, nestas condições, sem o gradiente de prótons, é demonstrada pela capacidade de promover a reação no sentido da hidrólise de ATP. Estas experiências demonstram a localização da ATP sintase (na realidade, de parte da enzima) nas microesferas.

Nos organismos até então analisados, a ATP sintase compreende dois componentes, cada um constituído por várias subunidades proteicas. Uma porção periférica, chamada *fator de acoplamento 1* (F_1), corresponde às microesferas e suas hastes, visíveis ao microscópio eletrônico. A segunda porção fica embebida na membrana — plasmática de bactérias, tilacóide de cloroplastos (Capítulo 15) e interna de mitocôndrias — e é chamada F_O, com a letra *o* subscrita, porque inclui, em mitocôndrias, uma subunidade que se liga à *oligomicina*, um inibidor da ATP sintase.

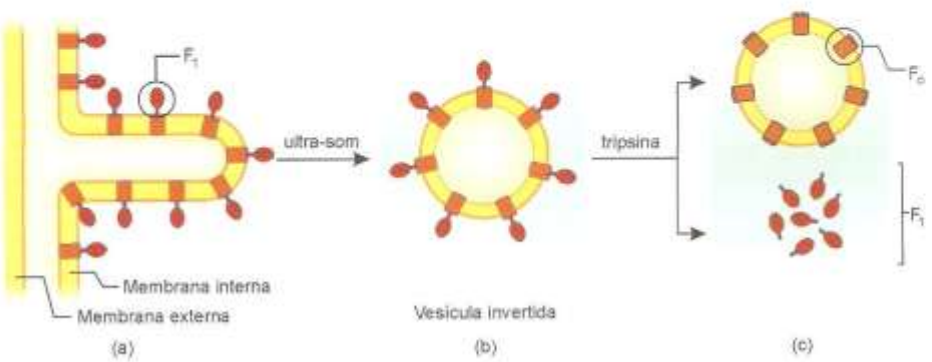


Fig. 11.13 Microesferas da membrana interna da mitocôndria e a ATP sintase. (a) A membrana interna é recoberta por microesferas com pedúnculos, voltadas para a matriz mitocondrial — o esquema mostra uma das numerosas invaginações desta membrana, chamadas *cristas*. (b) Formação de vesículas invertidas por tratamento de mitocôndrias com ultra-som. (c) As microesferas, formadas pelo componente F_1 da ATP sintase, podem ser removidas por diversos tratamentos, por exemplo, com tripsina, e mantêm sua atividade catalítica; as vesículas contêm o componente F_O da ATP sintase.

A Fig. 11.14 mostra o modelo aceito atualmente para a estrutura da ATP sintase de *Escherichia coli*. F_1, que se projeta para o citoplasma da célula bacteriana, é formado pelas subunidades $\alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon$; as seis subunidades maiores (três α e três β) dispõem-se, alternadamente, em um círculo ao redor da subunidade γ, que, por sua vez, está associada à subunidade ε; o hexâmero α_3-β_3 estabelece contato também com a subunidade δ. F_O, inserido na membrana plasmática, consta das subunidades $a\ b_2\ c_{10}$; as dez subunidades *c* compõem uma estrutura em anel e interagem com a subunidade *a*, que se liga ao dímero b_2. F_1 e F_O são unidos por um eixo central, constituído pelas subunidades γ-ε, e por um eixo lateral, com as subunidades δ-b_2.

F_1 catalisa a síntese de ATP por meio de três sítios ativos, um em cada subunidade β, junto a uma interface α/β. F_O contém os canais de passagem (de entrada e de saída) de prótons.

A ATP sintase converte energia química em mecânica

Como a energia liberada pela passagem de prótons através da ATP sintase é aproveitada para promover a reação entre ADP e P_i continua uma incógnita. A hipótese mais aceita estabelece que a reação ocorre em três etapas e que os três sítios catalíticos de F_1 podem apresentar-se em três conformações diferentes — cada etapa é cumprida por uma conformação específica. Durante a catálise, cada um dos sítios assume, seqüencialmente, uma configuração, de tal modo que, em um dado instante, etapas diferentes estão ocorrendo nos três sítios. As etapas seriam: ligação dos substratos (ADP e P_i), formação da ligação fosfoanidrido e liberação do ATP sintetizado.

A energia fornecida pela movimentação de prótons a favor do gradiente provoca as mudanças conformacionais dos sítios catalíticos. A seqüência, ainda hipotética, dos eventos é descrita a seguir e na Fig. 11.14.



Fig. 11.14 Modelo da ATP sintase de *Escherichia coli*. A enzima consiste em oito subunidades diferentes, com a estequiometria $\alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon\ a\ b_2\ c_{10}$. $F_1 = \alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon$; $F_O = a\ b_2\ c_{10}$. A porção F_1 estende-se da superfície interna da membrana plasmática para o citoplasma e F_O fica incluído na membrana. A maior parte da subunidade γ fica inserida na cavidade central do conjunto α_3-β_3; sua extremidade próxima à membrana interage com ε e o anel de subunidades *c* — o conjunto γ-ε-c_{10} atua como rotor. A subunidade δ associa-se com o hexâmero α_3-β_3 e o dímero b_2, e este liga-se à subunidade *a* — o conjunto α_3-β_3-δ-b_2-*a* é o estator. A subunidade *a* contém os canais de entrada (seta amarela) e de saída (seta branca) de prótons, situados, respectivamente, na superfície externa (voltada para o espaço periplasmático) e interna (em contato com o citoplasma) da membrana plasmática. Eles ganham acesso à membrana através do canal de entrada, ligam-se às subunidades *c*, provocando a sua rotação, e, após um giro completo, são liberados no citoplasma através do canal de saída de prótons. A rotação de c_{10} faz girar a subunidade γ no centro de α_3-β_3, o que causa as mudanças conformacionais dos sítios catalíticos, necessárias à síntese de ATP (apenas um dos três sítios está representado). A figura é baseada em Hutcheon ML et al: *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (15):8519-8524, 2001.

A subunidade *a* contém, na interface com as subunidades *c*, dois canais de passagem de prótons, cada um acessível de um lado diferente da membrana — o *canal de entrada* no lado externo, periplasmático[2], da membrana e o *canal de saída* no lado interno, citoplasmático, da membrana. Para atravessar a membrana, os prótons penetram no canal de entrada e ligam-se a cadeias laterais de aminoácidos (protonação) das subunidades *c*, fazendo girar o anel c_{10}. Após um giro completo, que resulta no retorno à interface *a/c* e no alinhamento com o canal de saída, os prótons são liberados (desprotonação) no citoplasma.

A rotação do anel c_{10} movimenta as subunidades γ e ε, que são associadas ao anel. Como a subunidade γ fica encaixada no centro da estrutura globular α_3-β_3, ao girar ela interage, sucessivamente, com as subunidades β, causando as alterações de conformação dos sítios catalíticos. Assim, a rotação do anel c_{10} em relação à subunidade *a* em F_O determina a rotação de γ em relação ao hexâmero α_3-β_3 em F_1. Em analogia a uma máquina motriz, as subunidades γ-ε-c_{10} constituem o *rotor*, e o conjunto α_3-β_3-δ-b_2-a, o *estator* (a parte de um motor que não gira durante o seu funcionamento). A passagem de prótons por F_O faz girar o rotor, que se move em relação às subunidades estacionárias. O eixo δ-b_2 mantém estáticos: o hexâmero α_3-β_3, enquanto γ gira dentro dele, e a subunidade *a*, enquanto o anel c_{10} roda, impedindo que α_3-β_3 e *a* girem junto com o rotor. A movimentação do rotor em relação ao conjunto α_3-β_3 e à subunidade *a* determina, respectivamente, a ativação dos sítios catalíticos e o transporte de prótons.

A prova decisiva sobre o funcionamento da ATP sintase foi obtida por visualização direta da rotação de uma única molécula de enzima. O movimento pôde ser filmado ao microscópio graças a um filamento fluorescente de actina ligado à subunidade γ, que funcionava como marcador.

Embora os princípios básicos desta hipótese continuem válidos, ela vem sofrendo modificações, frente a novas descobertas. Restam ainda muitas dúvidas sobre os mecanismos da translocação de prótons, das mudanças estruturais dos sítios catalíticos (que parecem ser em número maior do que três) e do acoplamento destes processos. Todavia, há um consenso de que a energia do gradiente de prótons, liberada pela passagem dos H^+ através de F_O, é mecanicamente transferida ao módulo catalítico (α_3-β_3), via o rotor γ-ε-c_{10}, e que o movimento de rotação causa as mudanças cíclicas dos sítios ativos. Em outras palavras, a ATP sintase converte energia química em mecânica, atuando como um "nanomotor" rotatório.

11.4 ACOPLAMENTO DO TRANSPORTE DE ELÉTRONS À SÍNTESE DE ATP: CONTROLE RESPIRATÓRIO

As velocidades do transporte de elétrons e da síntese de ATP são reguladas pela concentração de ADP

As necessidades celulares de ATP variam grandemente segundo o estado fisiológico. Durante a contração de músculos esqueléticos, por exemplo, a velocidade de utilização de ATP pode ser aumentada de 100 vezes em segundos. O ajuste da produção de ATP ao seu gasto é possível porque *o transporte de elétrons e a síntese de ATP são processos intimamente acoplados*, isto é, só há oxidação de coenzimas (NADH e $FADH_2$) se houver síntese de ATP, e vice-versa. O mecanismo de coordenação das velocidades do transporte de elétrons e da síntese de ATP chama-se *controle respiratório*.

O controle respiratório foi originalmente definido como a estimulação do consumo de oxigênio (*"respiração"*) por mitocôndrias isoladas, exercida por adição de ADP, seguida de seu decréscimo, à medida que ADP era convertido em ATP. Este fenômeno pode ser explicado pela teoria quimiosmótica: a maior disponibilidade de ADP estimula a ATP sintase, resultando em diminuição do gradiente eletroquímico graças à passagem de H^+ através da enzima. A diminuição do gradiente estimula as bombas de prótons da cadeia de transporte de elétrons (Complexos I, III e IV), que é, conseqüentemente, acelerada. Assim, quando a célula realiza processos que consomem energia, transformando ATP em ADP, aumenta a síntese de ATP e a oxidação de coenzimas. Quando o consumo de ATP é reduzido, a concentração de ADP é baixa e o transporte de prótons pela ATP sintase diminui, porque a entrada de H^+ na enzima requer ADP — a magnitude do gradiente de H^+ aumenta e passa a impedir a ação das bombas de prótons da cadeia, até que a energia necessária para bombear prótons para fora da mitocôndria, contragradiente, se iguala à energia liberada pelo transporte de elétrons, que, então, pára.

Ainda mais, a velocidade das vias que produzem coenzimas reduzidas (ciclo de Krebs, oxidação de ácidos graxos etc.) e dependem de sua oxidação pela cadeia de transporte de elétrons é também regulada pela disponibilidade de ADP.

---

[2] O *espaço periplasmático*, ou *periplasma*, localiza-se entre a membrana plasmática e a membrana externa de bactérias gram-negativas, como *E. coli*.

Dados recentes, obtidos por experimentação *in vivo*, indicam que o controle respiratório é muito mais complexo do que verificado em preparações de mitocôndrias, resultando da interferência de outros fatores, além da razão ADP/ATP. ***O controle respiratório será ainda abordado no Capítulo 20.***

11.5 INIBIDORES E DESACOPLADORES

A transferência de elétrons pode ser bloqueada por inibidores específicos

Há drogas capazes de atuar especificamente sobre cada um dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, impedindo o prosseguimento da transferência de elétrons (Tabela 11.2). O resultado desta ação inibitória é a paralisação do transporte de elétrons e das vias metabólicas que dependem da cadeia para a reoxidação de coenzimas. Deve-se notar que o resultado é o mesmo, qualquer que seja o componente da cadeia sobre o qual a droga atue. De fato, um transportador reduzido, incapaz de passar adiante seus elétrons, é também incapaz de receber elétrons do transportador antecedente. Deste modo, em instantes, todos os componentes da cadeia que se situam antes do ponto de atuação da droga estarão reduzidos, e a cadeia, inoperante. Sem o transporte de elétrons não se forma o gradiente de prótons e, conseqüentemente, não há síntese de ATP. Estas drogas são, portanto, potencialmente letais.

Tabela 11.2 Inibidores da cadeia de transporte de elétrons e o complexo sobre o qual cada um atua

Inibidores	Complexo
Barbituratos (hipnóticos)	I
Rotenona (inseticida)	I
Malonato (inibidor da succinato desidrogenase)	II
Antimicina A (antibiótico)	III
Cianeto (CN^-), monóxido de carbono (CO), azida (N^{3-})	IV

O transporte de elétrons pode ocorrer sem a síntese de ATP

No início do século passado, foi verificada uma síndrome grave em trabalhadores da indústria de explosivos que estavam expostos ao contato com ácido pícrico (trinitrofenol). O sintoma mais notável, que com freqüência levava a óbito, era a hipertermia. Foi este o fato inicial que levou à descoberta de um grupo de substâncias capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons. Hoje se sabe que algumas substâncias lipofílicas, como o *2,4-dinitrofenol* (*DNP*, de *dinitrophenol*), são capazes de dissociar o transporte de elétrons da fosforilação oxidativa; estas substâncias são chamadas *desacopladores*. Quando os dois processos são totalmente desacoplados, a síntese de ATP pára; o transporte de elétrons, termodinamicamente autônomo, pode prosseguir.

Graças ao seu caráter hidrofóbico, o DNP pode atravessar membranas e, como é também um ácido fraco, associa-se a prótons no exterior da mitocôndria (onde a concentração de H^+ é maior), liberando-os na matriz (Fig. 11.15). Impede assim a formação do gradiente de prótons, e a energia que seria usada na síntese de ATP é dissipada como calor. Nestas condições, o transporte de elétrons, feito sem o concomitante transporte de prótons contragradiente, torna-se energeti-



Fig. 11.15 Atuação do 2,4-dinitrofenol como desacoplador — o transporte de prótons através da membrana desfaz o gradiente necessário à síntese de ATP.

camente mais favorável e sua velocidade aumenta. De fato, medidas experimentais simples mostram que, em presença de desacopladores, uma suspensão de mitocôndrias consome oxigênio com velocidade maior do que na sua ausência. Nos anos que se seguiram a esta descoberta, o DNP chegou a ser usado como agente emagrecedor. A expectativa de sua administração era que, acelerando a oxidação de coenzimas sem a concomitante síntese de ATP, a degradação das reservas lipídicas fosse acelerada, ainda mais porque, com pequena produção de ATP, a síntese das gorduras também seria afetada. Este tipo de tratamento foi logo abandonado, porque levou a alguns acidentes fatais. Posteriormente, verificou-se que o DNP é também um agente mutagênico.

O desacoplamento artificialmente provocado por substâncias como o DNP tem seu correspondente fisiológico. Em uma condição hipotética de acoplamento perfeito, os prótons entram na mitocôndria somente através da ATP sintase, na presença de ADP. Todavia, diversas abordagens experimentais demonstram que as mitocôndrias são capazes de consumir oxigênio, mesmo na ausência de ADP. Como, nesta situação, os prótons não podem entrar via ATP sintase, fica evidenciado que existe um "vazamento" de H^+ através da membrana interna da mitocôndria. O retorno de prótons para a matriz mitocondrial, sem ser pela ATP sintase, diminui a força próton-motriz, levando à dissipação da energia de óxido-redução como calor — a eficiência da fosforilação oxidativa, definida pela razão P/O, diminui. O desacoplamento fisiológico resulta de processos diversos que reduzem a eficiência da fosforilação oxidativa, levando à *termogênese*, como, por exemplo, a migração de prótons catalisada por proteínas, diferentes da ATP sintase, descritas a seguir.

A função biológica do desacoplamento da fosforilação oxidativa é mais bem conhecida no tecido adiposo marrom[3] de mamíferos. A membrana interna das mitocôndrias deste tecido contém, além da ATP sintase, uma proteína transportadora de prótons, denominada *termogenina* ou *proteína desacopladora 1* ou *UCP1*, de ***Uncoupling Protein 1***. Na presença desta proteína, o gradiente de prótons nunca se estabelece com grande eficácia, e uma fração considerável da energia derivada do transporte de elétrons é continuamente dissipada como calor. Desta forma, a oxidação de substratos neste tecido corresponde a termogênese, importante na proteção de mamíferos recém-nascidos, os seres humanos inclusive, e animais adaptados a climas frios, hibernantes ou não. O tecido adiposo marrom, além de apresentar numerosas mitocôndrias, com alto conteúdo de UCP1, é densamente inervado e vascularizado, recebendo a maior parte do fluxo sangüíneo corporal; tais características permitem prover termogênese para todo o organismo. O mecanismo do desacoplamento por UCP1 ainda não é totalmente conhecido.

Nos seres humanos, e em outros mamíferos, o tecido adiposo marrom regride após a infância e UCP1 não é encontrada nos tecidos de adultos. Mas outras proteínas desacopladoras foram identificadas nestes organismos: UCP2 (expressa na maioria dos tecidos), UCP3 (no coração e em músculos esqueléticos), UCP4 e UCP5 (no cérebro); elas promovem, em relação à UCP1, um desacoplamento discreto. Esta característica seria responsável pelas funções fisiológicas atribuídas a estas proteínas, a saber: promover a termogênese de adaptação à exposição ao frio e durante o jejum (as UCPs são estimuladas por catecolaminas, liberadas nessas condições de estresse); reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio, que é proporcional ao potencial de membrana (ao transportarem prótons, fazem diminuir o gradiente eletroquímico e, portanto, a formação dessas espécies); acelerar o metabolismo oxidativo, graças à estimulação da cadeia de transporte de elétrons.

As UCPs têm sido consideradas um alvo potencial para o desenvolvimento de terapias para o controle da obesidade. Sua ação desacopladora moderada poderia ter um papel importante no controle do peso corpóreo, a longo prazo (meses ou anos), por atuarem como mediadoras da regulação da taxa metabólica basal pelos hormônios tireoidianos.

A oligomicina impede a síntese de ATP

A *oligomicina* é um antibiótico que inibe a produção de ATP. Sua ação é provocada por ligação ao componente F_O da ATP sintase, que se torna então impermeável a prótons. Como os processos de síntese de ATP e de transporte de elétrons são fortemente acoplados, a interrupção de um deles é de imediato refletida no outro — a manutenção do gradiente de prótons impede o prosseguimento do transporte de elétrons. Embora atuando em outro processo, a fosforilação oxidativa, o efeito deste tipo de inibidor é, portanto, idêntico ao dos inibidores da cadeia de transporte de elétrons (antimicina A, cianeto etc.): pára a síntese de ATP e pára o consumo de oxigênio, indicativo da parada do transporte de elétrons. Apesar disso, experimentalmente, pode-se distinguir com facilidade a inibição da ATP sintase da inibição da cadeia de transporte de elétrons. Basta adicionar à preparação inibida um desacoplador: se a inibição se exerce sobre a ATP sintase, o consumo de oxigênio é restaurado; se a inibição está sendo feita na cadeia de transporte de elétrons, o desacoplador é inócuo. Naturalmente, em ambos os casos, a formação de ATP permanece inibida.

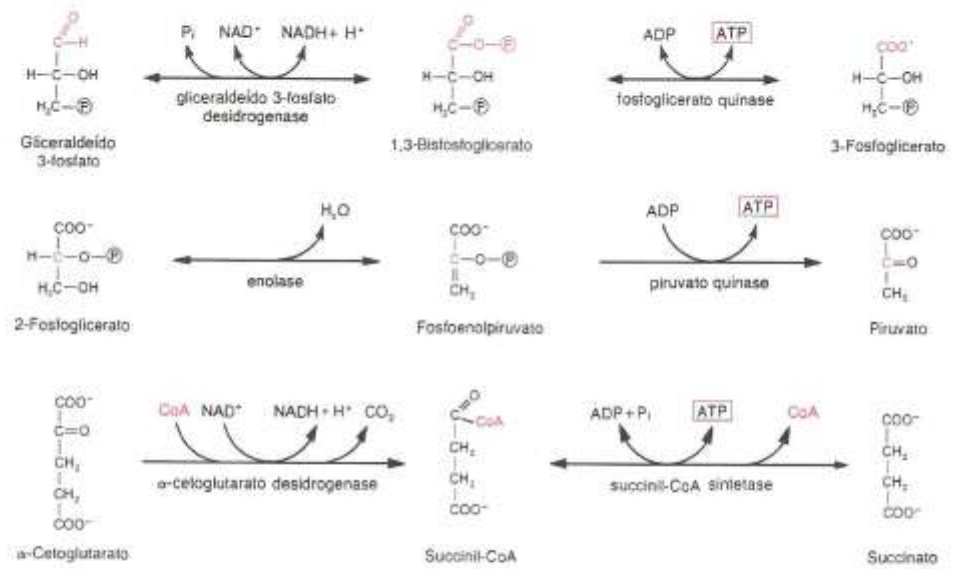
---

[3] O tecido adiposo marrom, diferentemente do tecido adiposo típico (ou *tecido adiposo branco*) contém grande número de mitocôndrias e, portanto, alto conteúdo de citocromos, que têm cor marrom.

11.6 FOSFORILAÇÃO NO NÍVEL DO SUBSTRATO

A fosforilação no nível do substrato não é afetada por desacopladores

Chama-se *fosforilação no nível do substrato* a síntese de ATP obtida diretamente em reações que fazem parte da glicólise e do ciclo de Krebs e que utilizam como substratos compostos ricos em energia: 1,3-bisfosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e succinil-CoA. Estas reações são sempre precedidas por reações de óxido-redução; no caso da desidratação do 2-fosfoglicerato, há uma óxido-redução intramolecular, onde um carbono é oxidado e outro reduzido. Na reação de óxido-redução, a energia é acumulada em uma ligação com fosfato ou CoA. Na reação seguinte, a ligação rica em energia é rompida e a energia é utilizada para a síntese de ATP (ATP ou GTP, no caso da succinil-CoA sintetase):



A produção de ATP pela fosforilação no nível do substrato responde por uma pequena fração do total produzido em condições aeróbias e, por ser independente do transporte de elétrons, não é afetada por desacopladores.

11.7 CADEIAS DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS BACTERIANAS

Nem sempre o aceptor final de elétrons é o oxigênio

Nas seções anteriores, foram descritas as características da cadeia de transporte de elétrons que se processa nas mitocôndrias, bastante conservada entre os eucariotos. Não é, entretanto, o único tipo de cadeia de transporte de elétrons encontrada nos seres vivos. Nas bactérias, encontram-se cadeias de transporte de elétrons muito mais diversificadas. Nestes organismos, embora os princípios gerais já descritos sejam obedecidos, há grandes variações quanto aos componentes da cadeia, desde os substratos iniciais fornecedores de elétrons até o seu aceptor final. Assim, além das coenzimas reduzidas, podem ser fornecedores de elétrons uma série de substratos inorgânicos, como NH_4^+, NO_2^-, H_2S, H_2, enxofre e ferro. O aceptor final pode também variar e, além do oxigênio, podem ter esta função: NO_3^-, NO_2^-, SO_4^{2-}, CO_3^{2-} e substâncias orgânicas, como o fumarato. Quando o aceptor final é diferente do oxigênio, a cadeia é dita anaeróbia e caracteriza a chamada *respiração anaeróbia*, em contraposição à "*respiração aeróbia*", que utiliza O_2 como aceptor final de elétrons. As diferentes modalidades de cadeias de transporte de elétrons bacterianas constituem adaptações importantes para o aproveitamento das substâncias disponíveis no meio ambiente — são características favoráveis na competição com outras espécies para a colonização de diferentes nichos ecológicos.

11.8 RENDIMENTO DA OXIDAÇÃO DA GLICOSE

A oxidação completa da glicose produz 38 ATP

A importância da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa como mecanismo de obtenção de energia dos organismos aeróbios fica evidenciada quando se analisa a produção de ATP a partir da oxidação de um nutriente como a glicose. O cômputo da quantidade total de ATP resultante da oxidação de glicose é facilitado pela análise, em separado, das etapas em que o processo se divide, ou seja, oxidação de:

I. glicose a 2 piruvato
II. 2 piruvato a 2 acetil-CoA
III. 2 acetil-CoA pelo ciclo de Krebs
IV. NADH e $FADH_2$ pela cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.

Em cada uma das etapas I a III, verifica-se a formação de coenzimas reduzidas e de ATP por fosforilação no nível do substrato, e somam-se estes valores. A quantidade de ATP produzida na fase IV por fosforilação oxidativa acoplada à oxidação deste total de coenzimas é obtida, considerando-se a síntese de 3 ATP para cada NADH e 2 para cada $FADH_2$. A oxidação completa de um mol de glicose está discriminada na tabela seguinte:

Etapa	I	II	III	I+II+III	IV	Mols de ATP formados
Coenzimas produzidas	2 NADH	2 NADH	6 NADH 2 $FADH_2$	10 NADH 2 $FADH_2$	30 ATP 4 ATP	30 4
Fosforilação no nível do substrato	2 ATP		2 ATP	4 ATP		4
Total						38

A oxidação biológica da glicose em condições aeróbias produz, portanto, 38 ATP. A equação geral deste processo é:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 + 38\,ADP + 38\,P_i \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O + 38\,ATP$$

Em algumas células de eucariotos, o rendimento da oxidação da glicose é reduzido de 38 para 36 ATP porque a oxidação de cada NADH produzido no citossol (glicólise) permite a síntese de apenas 2 ATP (seção seguinte).

11.9 OXIDAÇÃO DO NADH CITOSSÓLICO

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a NAD^+ e NADH, de modo que a oxidação do NADH citossólico não pode ser feita diretamente pela cadeia de transporte de elétrons. Entretanto, as coenzimas reduzidas no citossol podem ser indiretamente oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons, graças a sistemas designados *lançadeiras*. Nestes sistemas, os elétrons do NADH são transferidos para um composto citossólico que é capaz de atravessar a membrana interna da mitocôndria; alternativamente, os elétrons são passados para um composto que pode reduzir um componente da membrana interna. Por qualquer dos dois processos, o composto que transporta os elétrons é reoxidado ao doá-los, retorna ao citossol, e pode participar de um novo ciclo. Há duas lançadeiras conhecidas: a do malato-aspartato e a do glicerol fosfato.

1. *Lançadeira do malato-aspartato*. O NADH citossólico reduz oxaloacetato, em uma reação catalisada pela *malato desidrogenase* citossólica. O malato formado entra na mitocôndria, onde é oxidado pela malato desidrogenase mitocondrial, que também utiliza NAD^+ como coenzima (Fig. 11.16). Este processo leva à produção de NADH mitocondrial a partir de NADH citossólico, apesar de não haver permeabilidade da membrana interna ao NADH. O oxaloacetato formado na mitocôndria não atravessa a membrana interna, mas pode receber um grupo amino do glutamato, formando aspartato. Este sai da mitocôndria e, no citossol, regenera o oxaloacetato (Fig. 11.17). Como esta lançadeira é reversível, o seu sentido depende dos níveis de NADH citossólico e mitocondrial. A passagem de malato e aspartato através da

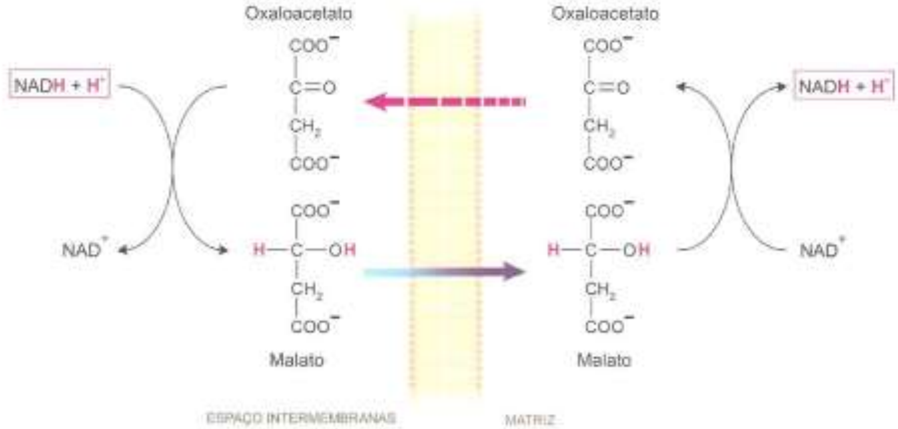


Fig. 11.16 Esquema simplificado da lançadeira do malato-aspartato. O transporte de malato para a matriz mitocondrial (seta azul) e a regeneração de oxaloacetato no citossol (seta vermelha tracejada) estão representados na Fig. 11.17.

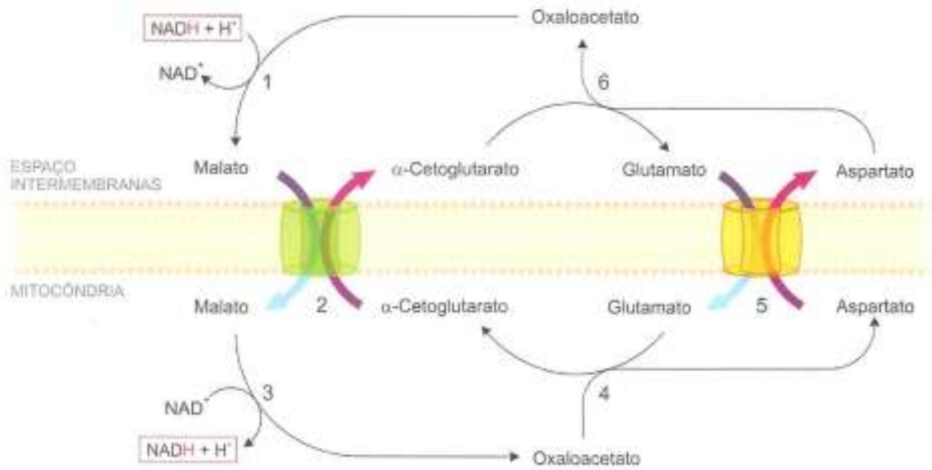


Fig. 11.17 Lançadeira do malato-aspartato. As enzimas e translocases (Seção 11.10) que participam da lançadeira são: (1) malato desidrogenase citossólica; (2) dicarboxilato translocase; (3) malato desidrogenase mitocondrial; (4) aspartato aminotransferase mitocondrial; (5) aspartato-glutamato translocase e (6) aspartato aminotransferase citossólica.

membrana interna da mitocôndria é efetuada por translocases presentes nesta membrana, que serão descritas na Seção 11.10. A lançadeira do malato-aspartato ocorre nas células hepáticas, cardíacas e renais de mamíferos.

2. *Lançadeira do glicerol fosfato.* O NADH citossólico reduz diidroxiacetona fosfato, em uma reação catalisada pela *glicerol 3-fosfato desidrogenase.* O glicerol 3-fosfato formado difunde-se até a face externa da membrana interna, onde se localiza uma isoenzima da glicerol 3-fosfato desidrogenase que contém FAD como grupo prostético. A diidroxiacetona fosfato é regenerada, produzindo $FADH_2$, que entrega os elétrons à coenzima Q (Fig. 11.18). Deve-se notar que, quando a lançadeira do glicerol fosfato é acionada, cada NADH origina apenas 2 ATP. Este decréscimo na produção de ATP por NADH citossólico oxidado garante a irreversibilidade do transporte de seus elétrons para o interior da mitocôndria, mesmo que a concentração de NADH no citossol seja baixa. Este sistema opera nos músculos de vôo de insetos e em músculos esqueléticos e cérebro de mamíferos.

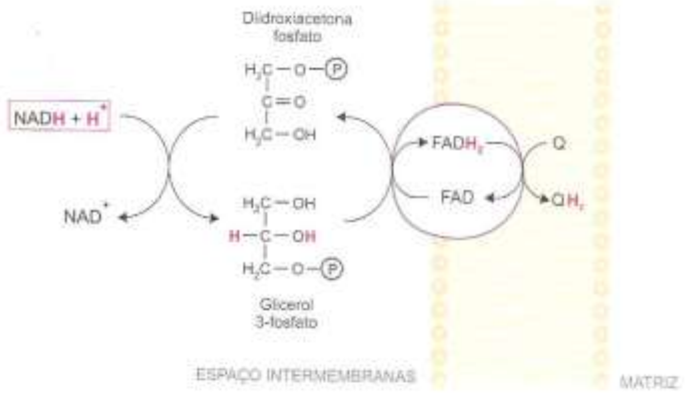


Fig. 11.18 Lançadeira do glicerol fosfato. A esfera representa a glicerol 3-fosfato desidrogenase situada na face externa da membrana interna, que contém FAD como grupo prostético.

11.10 TRANSPORTE DE METABÓLITOS ATRAVÉS DA MEMBRANA INTERNA DA MITOCÔNDRIA

A membrana interna da mitocôndria, ao contrário da membrana externa, é impermeável à maioria dos compostos. Apesar desta alta seletividade, o trânsito de muitos compostos entre a matriz mitocondrial e o citossol é propiciado pela existência de sistemas transportadores — *translocases* ou *permeases* — presentes na membrana interna da mitocôndria (Fig. 11.19). Quando não há um transportador específico, o composto é incapaz de atravessar a membrana.

Os sistemas de transporte da membrana interna da mitocôndria mais bem conhecidos são:

1. *Adenina nucleotídio translocase* ou *ATP/ADP translocase* — efetua a troca de uma molécula de ATP da matriz mitocondrial por uma molécula de ADP, externa. Sua atuação permite que o ATP sintetizado dentro da mitocôndria possa ser exportado para o citossol, onde ocorre a maioria dos processos que consomem energia. Esta translocase é uma proteína muito abundante, que chega a representar 15% do conteúdo proteico da membrana interna da mitocôndria.

A ATP/ADP translocase pode ser inativada por inibidores específicos, com o conseqüente bloqueio da fosforilação oxidativa. Um deles, *atractilosídio*, é um glicosídio tóxico, isolado de uma espécie de erva-daninha que cresce em pastagens, podendo ocasionar o envenenamento do gado. Outro inibidor conhecido é o *ácido bongcréquico*, antibiótico produzido por um fungo que cresce em uma comida típica à base de coco (*bongkrek*, em indonésio). O resultado da inibição da ATP/ADP translocase é o colapso da fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de elétrons. De fato, uma vez fosforilado todo o ADP presente na matriz mitocondrial, a ATP sintase torna-se inativa, por falta de substrato (ADP); a cadeia de transporte de elétrons, que atua acoplada à fosforilação oxidativa, também não pode prosseguir.

2. *Fosfato translocase* — catalisa o cotransporte (simporte) de fosfato e H^+ para a matriz mitocondrial. O transporte de fosfato é inibido por reagentes específicos para grupos sulfidrila, como a *N-etil-maleimida*.

É o resultado das ações conjugadas dessas duas translocases que provê a ATP sintase dos substratos (ADP e P_i) de que necessita.

3. *Dicarboxilato translocase* — promove a troca de dicarboxilatos (malato, succinato, fumarato e α-cetoglutarato) por fosfato, ou troca de um dicarboxilato por outro.

4. *Tricarboxilato translocase* — efetua o antiporte de tricarboxilatos (citrato, isocitrato) e fosfoenolpiruvato por malato ou por tricarboxilatos.

5. *Piruvato translocase* ou *monocarboxilato translocase* — permite a entrada, na mitocôndria, do piruvato produzido no citossol, acoplada à saída de OH^-.

6. *Aspartato-Glutamato translocase* — medeia a saída de aspartato da matriz em troca de glutamato e H^+ do citossol.

7. *Sistemas transportadores de íons Ca^{2+}* — dois sistemas transportadores de cálcio da membrana interna são importantes: um uniportador que possibilita a entrada de Ca^{2+} e um antiportador que introduz na mitocôndria 3 Na^+ para cada Ca^{2+} que sai.

As mitocôndrias, assim como o retículo endoplasmático, constituem um reservatório de cálcio e participam da regulação de sua concentração celular, colaborando para manter os níveis citossólicos de Ca^{2+} caracteristicamente baixos,

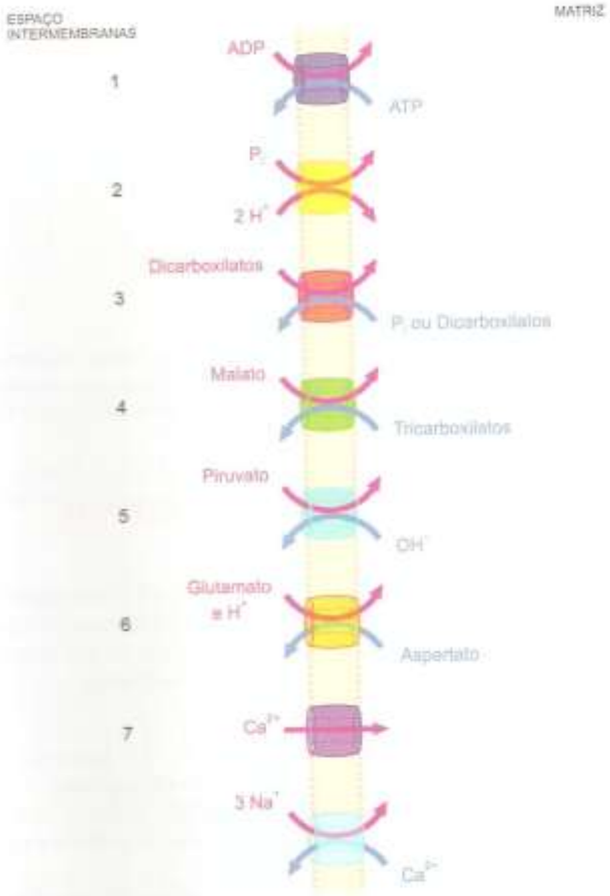


Fig. 11.19 Translocases da membrana interna da mitocôndria, numeradas de 1 a 7 e descritas no texto.

próximos de 10^{-7}M. Esta regulação é fundamental, porque pequenas alterações na concentração de cálcio sinalizam o início de processos celulares de grande importância, que serão analisados na *Parte 4 — Regulação do Metabolismo*.

A dicarboxilato translocase e a aspartato-glutamato translocase participam da lançadeira do malato-aspartato (Fig. 11.17). As atuações das demais translocases alistadas e ainda de outros sistemas transportadores estão incluídas na descrição das vias metabólicas.

O transporte de metabólitos e íons através da maioria das permeases da membrana interna da mitocôndria é do tipo ativo. A energia necessária para seu funcionamento é derivada do gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons acoplado à cadeia de transporte de elétrons. As permeases contribuem, portanto, para a dissipação da força próton-motriz, reduzindo o rendimento em ATP. Deste modo, uma parcela significativa da energia derivada do transporte de elétrons é utilizada para contornar a impermeabilidade da membrana interna.

BIBLIOGRAFIA

Dimroth P et al: Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. *EMBO reports* **7**:276-282, 2006.
Frey TG, Mannella CA: The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**:319-324, 2000.
Garvey WT: The role of uncoupling protein 3 in human physiology. *J Clin Invest* **111**:438-441, 2003.
Hinkle PC: P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1706**:1-11, 2005.
Hunte C et al: Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc_1 complex. *FEBS Lett* **545** (1):39-46, 2003.
Kadenbach B: Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1604** (2):77-94, 2003.
Kunji ERS: The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett* **564** (3):239-244, 2004.

...der S: Review – Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care* **10**:208, 2006.
...dova AA et al: Substrate-induced conformational change in bacterial complex I. *J Biol Chem* **279** (22):23830-23836, 2004.
...ell P: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**:144-148, 1961.
...lls DG: Commentary on: 'Old and new data, new issues: The mitochondrial ΔΨ' by H. Tedeschi. *Biochim Biophys Acta* **1710** (2-3):63-65, 2005.
... H, Yoshida M: The rotatory machine in cell, ATP synthase. *J Biol Chem* **276** (3):1665-1668, 2001.
...otun KS, Lemire BD: The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *J Biol Chem* **279** (10):9424-9431, 2004.
...schi H: Old and new data, new issues: The mitochondrial ΔΨ. *Biochim Biophys Acta* **1709** (3):195-202, 2005.
...schi H: Reply to David Nicholls' response. *Biochim Biophys Acta* **1710**:66, 2005.
...er J, Senior AE: ATP synthesis driven by proton transport in F_1F_0-ATP synthase. *FEBS Lett* **545** (1):61-70, 2003. In: Trumpower BL (editor): Protonmotive Mechanisms of Energy Transduction Enzymes. *FEBS Lett – Special Issue* **545** (1), 2003.
...kawa S et al: Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Science* **280** (5370):1723-1729, 1998.

12

Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato

12.1 FUNÇÕES DA VIA DAS PENTOSES FOSFATO

A via das pentoses fosfato é uma via alternativa de oxidação de glicose, que leva à produção de dois compostos importantes: *ribose 5-fosfato* e a forma reduzida da *nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH)* (Fig. 12.1), uma coenzima com estrutura semelhante à do NADH. A ribose 5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídios que compõem os ácidos nucleicos e de várias coenzimas (NAD^+, $NADP^+$, FAD, FMN, coenzima A, ATP, GTP etc.). O NADPH atua como coenzima doadora de hidrogênio em sínteses redutoras e em reações de proteção contra compostos oxidantes. São ainda produzidos nesta via outros açúcares fosforilados, com número variável de átomos de carbono.

Em vias degradativas, como glicólise, ciclo de Krebs, ciclo de Lynen etc., o substrato é oxidado, gerando coenzimas reduzidas — NADH e $FADH_2$ —, a partir de cuja oxidação se produz ATP. Na síntese de muitos compostos, ocorre o reverso: há consumo de ATP e redução do substrato por coenzimas reduzidas. A coenzima utilizada em tais reduções é o *NADPH*, que passa à forma *$NADP^+$*; a volta à forma reduzida é cumprida pela via das pentoses fosfato. As duas coenzimas — NAD^+ e NADPH — têm, então, papéis metabólicos opostos: a primeira é utilizada quando um substrato está sendo oxidado e a segunda, quando um substrato está sendo reduzido. Igualmente diferentes são os processos de regeneração das duas coenzimas: o NADH produzido no metabolismo degradativo é reoxidado na cadeia de transporte

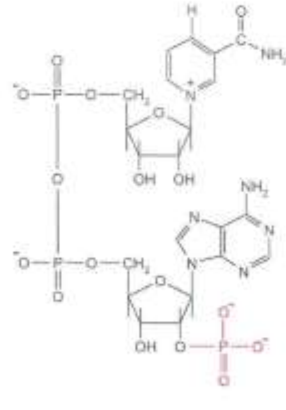


Fig. 12.1 Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato ($NADP^+$). Este dinucleotídio difere do NAD^+ (Fig. 9.2) apenas pela presença de um grupo fosfato (em vermelho) esterificado ao carbono 2 da ribose do nucleotídio de adenina.

de elétrons; o NADPH não é substrato da cadeia de transporte de elétrons, e sua oxidação é feita em vias de sínteses redutoras, como a síntese de ácidos graxos e de esteróides.

Na via das pentoses fosfato, portanto, a energia derivada da oxidação da glicose é exclusivamente armazenada sob a forma de poder redutor (NADPH) e não de NADH e ATP, como na glicólise.

12.2 ETAPAS DA VIA DAS PENTOSES FOSFATO

A via das pentoses fosfato consta de uma parte oxidativa, que produz NADPH, e de uma parte não-oxidativa, que interconverte açúcares fosforilados

A via das pentoses fosfato (Fig. 12.2) compreende uma etapa inicial, *oxidativa*, em que a glicose 6-fosfato sofre descarboxilação, originando uma pentose fosfato (ribulose 5-fosfato) e NADPH. Esta transformação ocorre por meio de duas reações de oxidação catalisadas por *desidrogenases* específicas para $NADP^+$, intercaladas por uma reação de hidrólise. A equação geral desta etapa é:

$$\text{Glicose 6-fosfato} + 2\,NADP^+ + H_2O \longrightarrow \text{Ribulose 5-fosfato} + 2\,NADPH + 2\,H^+ + CO_2$$

A etapa oxidativa ocorre no sentido da conversão de $NADP^+$ a NADPH graças à irreversibilidade da reação catalisada pela *lactonase*.

A etapa subseqüente, *não-oxidativa*, constitui um sistema de rearranjos moleculares, que forma açúcares fosforilados com 3, 4, 5, 6 ou 7 átomos de carbono. A ribulose 5-fosfato é transformada a ribose 5-fosfato ou xilulose 5-fosfato por ação de uma *isomerase* ou de uma *epimerase*, respectivamente. Estas pentoses sofrem, a seguir, uma série de conversões, catalisadas por duas enzimas: a *transcetolase*, que transfere grupos de dois carbonos e tem tiamina pirofosfato (TPP, Seção 9.2) como grupo prostético, e a *transaldolase*, que transfere grupos de três carbonos. Nos dois casos, a transferência é feita de uma cetose para uma aldose. Todas as reações da etapa não-oxidativa são reversíveis, permitindo a livre interconversão de açúcares.

A via das pentoses fosfato e a glicólise, apesar de terem funções tão diferentes, são intimamente relacionadas, já que ambas ocorrem no citossol e apresentam compostos intermediários comuns: glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. O compartilhamento de compostos e a reversibilidade das reações da etapa não-oxidativa da via das pentoses fosfato tornam possível canalizar os açúcares fosforilados desta via para a glicólise ou vice-versa. Adicionalmente, as duas etapas, oxidativa e não-oxidativa, podem ser acionadas em separado — o caminho a ser seguido pela glicose 6-fosfato na via das pentoses fosfato é determinado pelas demandas celulares de NADPH ou ribose 5-fosfato, principalmente. ***O funcionamento diferencial da via das pentoses fosfato frente a algumas situações metabólicas será analisado na regulação desta via no Capítulo 20 (Seção 20.3).***

A via das pentoses é amplamente distribuída pelos tecidos; as reações que compõem a parte oxidativa são sobremodo ativas em tecidos engajados nas sínteses de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteróides, as quais utilizam NADPH como agente redutor. Estas sínteses (Capítulo 16) acontecem principalmente no fígado, tecido adiposo, glândulas mamárias e córtex da supra-renal. No fígado, 20-30% da oxidação de glicose é feita pela via das pentoses fosfato. O NADPH desempenha funções adicionais, descritas a seguir.

12.3 NADPH E MECANISMOS ANTIOXIDANTES

O NADPH constitui uma reserva importante de poder redutor, imprescindível não só para as sínteses citadas, mas também para os mecanismos celulares que previnem o estresse oxidativo. Em diversas reações do metabolismo oxidativo, são produzidas espécies reativas de oxigênio, devido à redução parcial do oxigênio (Seção 11.2). Estas espécies radicalares reagem praticamente com qualquer composto, as macromoléculas inclusive, causando alterações estruturais irreversíveis. Os organismos dispõem de sistemas enzimáticos (superóxido dismutase e catalase) e não-enzimáticos (vitaminas antioxidantes) capazes de dissipar os radicais livres, contribuindo para a manutenção da integridade funcional das células.

As hemácias são células particularmente sensíveis ao dano oxidativo, por disporem de um leque de vias metabólicas muito restrito, sendo incapazes de repor macromoléculas danificadas. Além disto, durante o transporte de oxigênio, uma pequena fração de oxigênio pode dissociar-se do grupo heme e gerar radicais livres. Graças, ainda, ao seu alto conteúdo de hemoglobina, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode reagir com o íon ferroso, originando o radical hidro-

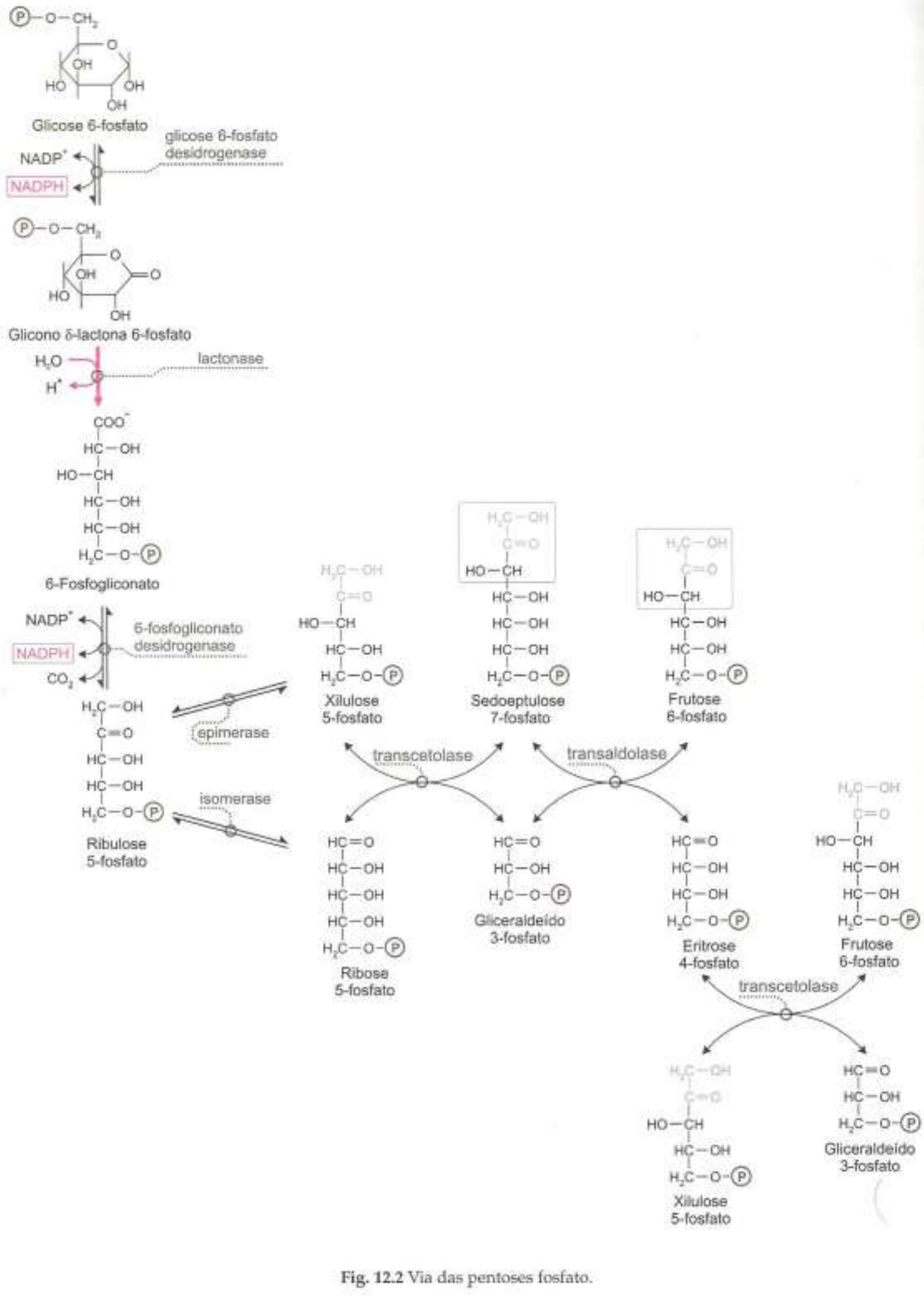


Fig. 12.2 Via das pentoses fosfato.

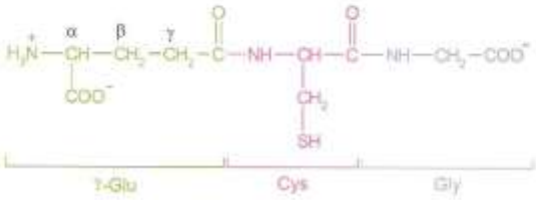


Fig. 12.3 Estrutura da glutationa, um tripeptídio formado por glutamato (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly). A ligação peptídica entre Glu e Cys é exótica, porque envolve a γ-carboxila do glutamato.

xila, que é extremamente reativo. A exposição a concentrações aumentadas de espécies reativas de oxigênio provoca oxidação de grupos sulfidrila de proteínas, peroxidação de lipídios e oxidação do ferro da hemoglobina. Segue-se a descrição de um processo antioxidante, no qual o NADPH atua em associação com o tripeptídio *glutationa* (γ-glutamilcisteinilglicina) (Fig. 12.3).

A estrutura nativa de muitas proteínas depende da manutenção de grupos SH de resíduos de cisteína, nesta forma reduzida. Como mencionado, espécies reativas de oxigênio produzidas normalmente no metabolismo ou resultantes da ingestão de substâncias exógenas (drogas, medicamentos) podem provocar a oxidação de grupos sulfidrila a dissulfeto. A glutationa promove a redução das pontes dissulfeto, reconvertendo-as a grupos SH. Ao exercer a sua ação redutora, os grupos SH de duas moléculas de glutationa (GSH) são oxidados, passando a constituir o grupo S – S da glutationa dissulfeto (GSSG). A restauração da forma SH da glutationa é obtida por reação com NADPH (Fig. 12.4).

A glutationa também participa da eliminação de peróxidos. O peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila, que reage com ácidos graxos poliinsaturados componentes de fosfolipídios da membrana plasmática, levando à peroxidação dos ácidos graxos: a estrutura da membrana é rompida, provocando lise da hemácia. Os peróxidos — H_2O_2 ou peróxidos orgânicos (RO_2H) — são reduzidos pela glutationa por ação da *glutationa peroxidase* (reações 1 e 2), uma enzima peculiar por conter selênio. A glutationa dissulfeto é reduzida por NADPH, a coenzima da *glutationa redutase* (3):

$$2\,G-SH + H_2O_2 \longrightarrow G-S-S-G + 2\,H_2O \qquad (1)$$

$$2\,G-SH + R-O-O-H \longrightarrow G-S-S-G + ROH + H_2O \qquad (2)$$

$$G-S-S-G + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\,G-SH + NADP^+ \qquad (3)$$

É ainda a glutationa a responsável pela manutenção do íon de ferro do grupo heme da hemoglobina no estado de oxidação 2^+, tornando-a capaz de ligar-se com o oxigênio; a oxidação do íon ferroso a Fe^{3+} origina a meta-hemoglobina, que não transporta oxigênio.

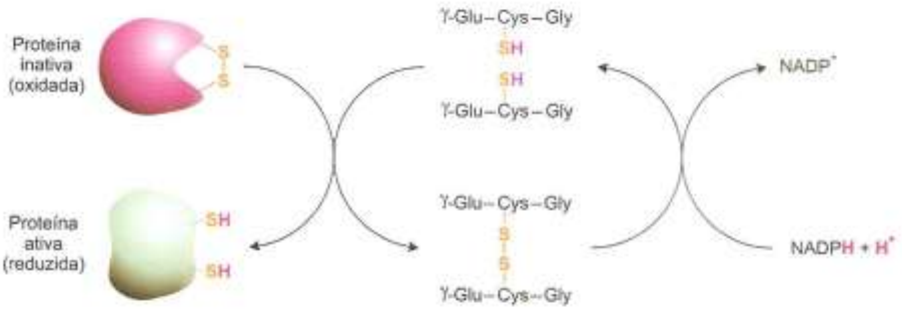


Fig. 12.4 Atuação da glutationa (γ-Glu-Cys-Gly) como agente redutor. No exemplo, a proteína com grupos sulfidrila de resíduos de cisteína oxidados (– S – S –) é inativa. A forma ativa (grupos SH) é recuperada por reação da forma oxidada com duas moléculas de glutationa (G – SH), que se converte a glutationa dissulfeto (G – S – S – G). A regeneração da forma reduzida da glutationa é obtida por reação com NADPH.

12.4 DEFICIÊNCIA GENÉTICA DE GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE

A deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase pode ser vantajosa

A deficiência hereditária de uma enzima geralmente provoca uma moléstia. Todavia, em alguns casos, genes defectivos trazem alguma vantagem seletiva, como acontece com a anemia falciforme e as talassemias (Seção 3.5). Um outro exemplo é a *deficiência da glicose 6-fosfato desidrogenase*, que catalisa a primeira reação da via das pentoses fosfato, que produz NADPH, essencial para prevenir o dano oxidativo em hemácias. A falta parcial da enzima pode ser benéfica, embora em circunstâncias muito definidas e restritas — a distribuição geográfica dos mais de 400 milhões de portadores desta carência enzimática correlaciona-se com regiões onde a malária é moléstia endêmica. A freqüência de portadores nessas regiões chega a 25%, mostrando que o gene mutante confere alguma proteção contra o *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária. Como este protozoário cumpre parte de seu ciclo vital nas hemácias, é provável que hemácias com baixa atividade de glicose 6-fosfato desidrogenase constituam um ambiente inóspito para o seu crescimento. A contrapartida do efeito protetor (redução de até 60% do risco de contrair malária grave) do defeito genético é uma suscetibilidade aumentada ao estresse oxidativo.

Nos indivíduos mutantes para o gene de glicose 6-fosfato desidrogenase, a atividade da enzima nas hemácias não é completamente ausente, mas drasticamente diminuída, variando de 3 a 15% da atividade normal. A atividade residual é suficiente para que os portadores sejam assintomáticos. Entretanto, condições em que são geradas quantidades grandes de peróxidos exigem também quantidades grandes de NADPH, que esses indivíduos são incapazes de produzir — instala-se, então, um quadro de anemia hemolítica grave. Uma destas condições é a administração de *primaquina*, um antimalárico de uso corrente. A indução de hemólise seria mediada por um metabólito da primaquina, ainda não identificado, que estimularia a formação de H_2O_2 e de outras espécies reativas de oxigênio.

BIBLIOGRAFIA

Bowman ZS et al: Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(2):838-845, 2005.

Scofield RF et al: The nature of the pentose pathway in liver. *J Biol Chem* **260**(29):15439-15444, 1985.

Scriver CR et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Sivilotti ML: Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicol Rev* **23**(3):169-188, 2004.

Wajcman H, Galacteros F: Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents. *C R Biol* **327**(8):711-720, 2004.

13

Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose

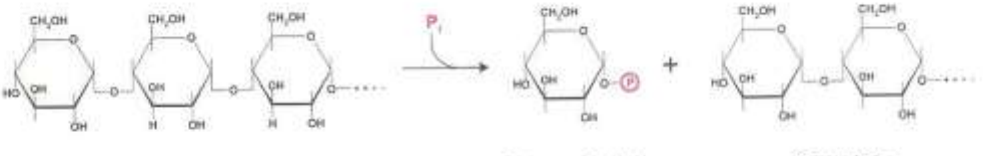
13.1 METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

O glicogênio é um polímero de glicose e constitui uma forma de reserva deste açúcar. A vantagem biológica de armazenar glicose polimerizada é a redução da osmolaridade, resultante do menor número de partículas em solução. Nos mamíferos, as principais reservas de glicogênio ocorrem no fígado e em músculos esqueléticos e correspondem, em média, a 100 e 300 g, respectivamente. O glicogênio é sintetizado por estes órgãos quando a oferta de glicose aumenta, como acontece após as refeições. Ao serem degradadas, essas reservas atendem necessidades diferentes. O glicogênio hepático é degradado produzindo glicose, que é exportada para manter a glicemia nos períodos entre as refeições, particularmente no jejum noturno. O glicogênio muscular provê energia para a própria fibra muscular. Em contração intensa, quando a demanda energética ultrapassa o aporte de oxigênio, o glicogênio é convertido a lactato. Em anaerobiose relativa, apenas os carboidratos podem servir como substrato para a obtenção de ATP, pois lipídios e aminoácidos só podem ser degradados aerobiamente.

As enzimas que catalisam a síntese e a degradação do glicogênio, além de proteínas reguladoras destes processos, estão intimamente associadas ao polímero em grânulos citossólicos.

A degradação do glicogênio produz glicose 1-fosfato

A degradação do glicogênio (*glicogenólise*) consiste na remoção sucessiva de resíduos de glicose, a partir das extremidades não-redutoras, por ação da *glicogênio fosforilase*, uma enzima que tem piridoxal fosfato, um derivado da vitamina B_6, como grupo prostético. Esta enzima catalisa a fosforólise da ligação α-1,4, liberando um resíduo de glicose como glicose 1-fosfato. A reação é semelhante a uma hidrólise, com a diferença de usar fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4, representado por P_i) no lugar da água:



Glicogênio (*n* resíduos de glicose) — Glicose 1-fosfato — Glicogênio (*n* - 1 resíduos de glicose)

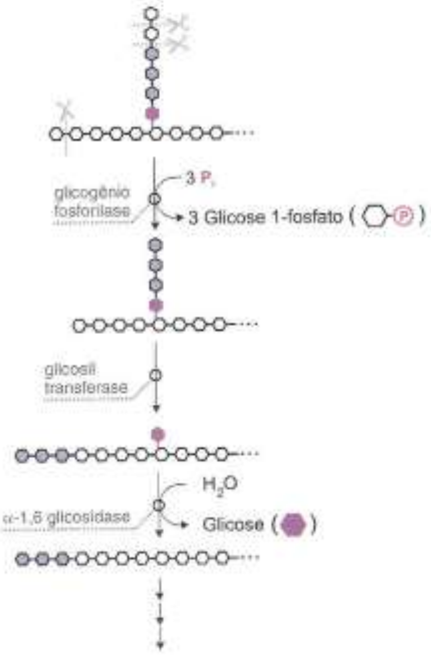


Fig. 13.1 Esquema da degradação do glicogênio.

A ação da glicogênio fosforilase prossegue ao longo da cadeia, liberando um a um os resíduos de glicose, mas termina 4 resíduos antes de uma ramificação. A degradação pode continuar por ação de outra enzima, a *enzima desramificadora*, que apresenta duas atividades distintas. Atua como *glicosil transferase*, transferindo 3 dos 4 resíduos de glicose remanescentes na ramificação para uma outra extremidade da cadeia de glicogênio, formando uma nova ligação α-1,4 (Fig. 13.1); na sua nova posição, estes resíduos podem ser liberados por ação da glicogênio fosforilase. O resíduo de glicose restante é aquele que está ligado à cadeia principal por ligação α-1,6; esta ligação é hidrolisada pela segunda atividade da enzima desramificadora, a atividade de *α-1,6 glicosidase*. É interessante que, neste caso, ocorre uma hidrólise, em lugar da fosforólise produzida pela glicogênio fosforilase — cerca de 10% dos resíduos de glicose do glicogênio são liberados como *glicose* e o restante como *glicose 1-fosfato*.

A glicose 1-fosfato é convertida pela *fosfoglicomutase* a glicose 6-fosfato, que pode ser degradada pela glicólise, formando lactato, no músculo. No fígado, a glicose 6-fosfato é preferencialmente hidrolisada por ação da *glicose 6-fosfatase*, produzindo glicose, que é liberada na circulação.

A degradação de glicogênio é um processo rápido e eficiente, graças à sua própria estrutura e à presença das enzimas de degradação intimamente associadas aos grânulos de glicogênio: o grande número de ramificações da cadeia possibilita a ação simultânea de muitas moléculas de fosforilase a partir de cada uma das extremidades não-redutoras. Assim, cerca de 50% das ramificações da cadeia de glicogênio muscular são degradadas em poucos segundos, quando a demanda energética é intensa. No caso da glicogenólise hepática, a rapidez do processo corrige o nível glicêmico, evitando a hipoglicemia. A degradação do glicogênio geralmente não é completa, restando um núcleo não degradado que serve de ponto de partida para a ressíntese.

A síntese de glicogênio utiliza como precursor uma forma ativada de glicose e gasta 2 ATP por glicose incorporada

O glicogênio é sintetizado pela *glicogênese*, uma via diferente da via de degradação. A síntese consiste na repetida adição de unidades de glicose às extremidades não-redutoras de um fragmento de glicogênio. A glicose a ser incorporada deve estar sob uma forma ativada, ligada a um nucleotídio de uracila, constituindo *uridina difosfato glicose* (UDP-G) (Fig. 13.2). UDP-G é produzido, a partir de glicose, por uma série de reações: (1) fosforilação de glicose, com consu-



Fig. 13.2 Estrutura da uridina difosfato glicose (UDP-G).

mo de ATP, catalisada pela glicoquinase no fígado ou hexoquinase no músculo; (2) isomerização da glicose 6-fosfato a glicose 1-fosfato pela fosfoglicomutase e (3) reação deste açúcar com UTP formando UDP-G e pirofosfato ($HP_2O_7^{3-}$ ou PP_i), promovida pela *UDP-glicose pirofosforilase*:

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP} + \text{H}^+ \quad (1)$$

$$\text{Glicose 6-fosfato} \rightleftharpoons \text{Glicose 1-fosfato} \quad (2)$$

$$\text{Glicose 1-fosfato} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDP-G} + \text{PP}_i \quad (3)$$

A formação de UDP-G está detalhada na Fig. 13.3. UDP-G é substrato da *glicogênio sintase*, a enzima que, efetivamente, catalisa a síntese — ela transfere a unidade glicosil do UDP-G para uma das extremidades não-redutoras do glicogênio, formando uma ligação α-1,4:

$$\text{UDP-G} + (\text{Glicogênio})_{n\ \text{resíduos de glicose}} \longrightarrow (\text{Glicogênio})_{n+1\ \text{resíduos de glicose}} + \text{UDP} \quad (4)$$

O UDP produzido nesta reação é reconvertido a UTP à custa de ATP, pela *nucleosídio difosfato quinase* (5). O pirofosfato formado na reação 3 é hidrolisado por ação da *pirofosfatase*, produzindo fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} ou P_i) (6):

$$\text{UDP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{UTP} + \text{ADP} \quad (5)$$

$$\text{PP}_i + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\,\text{P}_i + \text{H}^+ \quad (6)$$

A soma das reações 1 a 6 é:

$$\text{Glicose} + 2\,\text{ATP} + (\text{Glicogênio})_{n\ \text{resíduos de glicose}} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow (\text{Glicogênio})_{n+1\ \text{resíduos de glicose}} + 2\,\text{ADP} + 2\,\text{P}_i$$

mostrando um gasto de 2 ATP para cada resíduo de glicose incorporado ao glicogênio.

Além da glicogênese, muitos processos biossintéticos contêm reações reversíveis que produzem PP_i. O pirofosfato é sempre hidrolisado pela pirofosfatase, uma enzima muito ativa e amplamente distribuída pelos tecidos. Esta hidrólise, altamente irreversível, é um fator importante para encaminhar os processos no sentido da síntese.

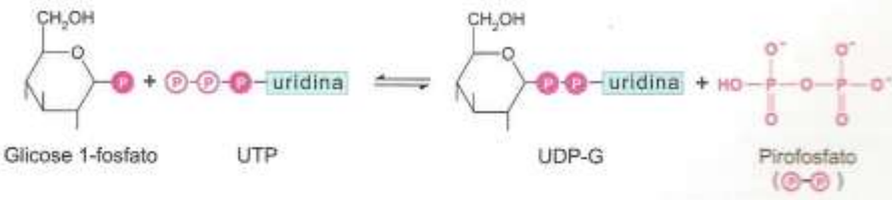


Fig. 13.3 Reação catalisada pela UDP-glicose pirofosforilase.

A glicogênio sintase catalisa apenas a síntese de ligações α-1,4. As ramificações são feitas por uma *enzima ramifica-dora*, que transfere uma pequena cadeia de 6 ou 7 resíduos de glicose da extremidade para uma parte mais interna da molécula, criando uma ligação α-1,6 (Fig. 13.4). A síntese prossegue por adição de resíduos de glicose às extremidades não-redutoras, catalisada pela glicogênio sintase.

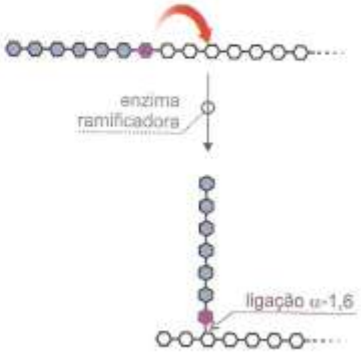


Fig. 13.4 Formação de uma ramificação da cadeia do glicogênio.

A reação promovida pela glicogênio sintase prevê a existência de uma cadeia de glicogênio já constituída (*primer*), à qual são agregadas novas unidades de glicose — a enzima não é capaz de promover a união das duas primeiras unida-des de glicose, para iniciar o polímero. Quando, na degradação anterior, não houver permanecido um núcleo de glico-gênio que dê o suporte para a extensão da cadeia, faz-se necessária a atuação de uma outra proteína, a *glicogenina*. Ela inicia a síntese transferindo o primeiro resíduo de glicose, derivado de UDP-G, ao grupo OH da cadeia lateral de um dos seus resíduos de tirosina. Em seguida, a glicogenina catalisa a incorporação de novos resíduos de glicose (sempre como UDP-G), até formar uma pequena cadeia de 8 resíduos. Neste momento entra em ação a glicogênio sintase, que prossegue a polimerização, e a glicogenina desliga-se do polímero em crescimento.

As vias de degradação e síntese do glicogênio hepático estão resumidas na Fig. 13.5. No músculo, as reações que inter-convertem glicogênio e glicose 6-fosfato são idênticas às do fígado. No entanto, no músculo, a glicose 6-fosfato não pode originar glicose, devido à ausência de glicose 6-fosfatase; além disso, a fosforilação da glicose é feita pela hexoquinase. No ***Capítulo 20 serão descritos os processos de regulação da síntese e degradação do glicogênio hepático e muscular.***

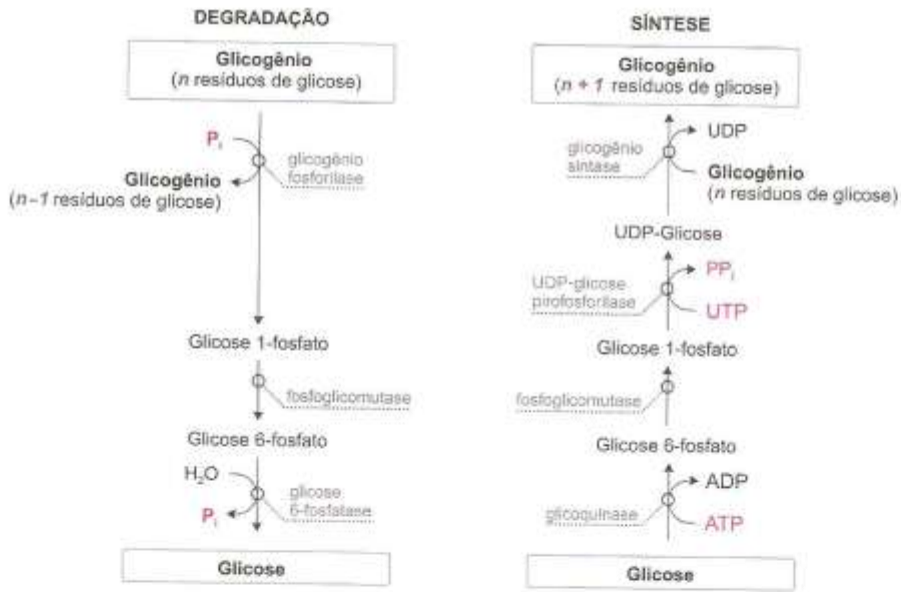


Fig. 13.5 Esquema geral da degradação e síntese de glicogênio no fígado.

Doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio

São conhecidas várias moléstias hereditárias cuja causa primária é a deficiência (ausência ou diminuição da atividade) de uma das enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio. Os portadores destas moléstias geralmente apresentam aumento do depósito de glicogênio que, em alguns casos, aparece com estrutura anormal. A Tabela 13.1 apresenta uma lista das doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio, indicando a enzima alterada e alguns dos sintomas observados nos portadores destas anomalias.

Tabela 13.1 Doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio

Tipo	Nome	Enzima deficiente	Conseqüências
I	von Gierke	Glicose 6-fosfatase	Acúmulo de glicogênio hepático e hepatomegalia; inabilidade de corrigir a glicemia no jejum
II	Pompe	α-1,4 Glicosidase[1]	Acúmulo generalizado de glicogênio; insuficiência cardiorrespiratória e morte geralmente antes dos 2 anos de idade
III	Cori	Enzima desramificadora	Glicogênio com ramificações curtas, resultantes da ação da glicogênio fosforilase; hipoglicemia e hepatomegalia menos severas que no tipo I
IV	Andersen	Enzima ramificadora	Glicogênio com cadeias muito longas não ramificadas; morte geralmente antes dos 2 anos de idade
V	McArdle	Glicogênio fosforilase muscular	Incapacidade de realizar exercícios intensos
VI	Hers	Glicogênio fosforilase hepática	Semelhantes às do tipo I, mas menos intensas
VII	Tarui	Fosfofrutoquinase 1 muscular	Semelhantes à do tipo V

[1]Enzima lisossômica que hidrolisa os segmentos lineares do glicogênio; em indivíduos normais, constitui uma via secundária do metabolismo do glicogênio.

13.2 SÍNTESE DE AMIDO

O amido é composto por cadeias lineares de resíduos de glicose unidos por ligações α-1,4 e cadeias contendo ramificações formadas por ligações α-1,6 (a estrutura do amido está descrita à Seção 6.1). A síntese do amido, como a do glicogênio, envolve a ação coordenada de uma *sintase*, que catalisa a adição de unidades de glicose às extremidades não-redutoras via ligações α-1,4, e de uma *enzima ramificadora*, que promove a formação das ligações α-1,6. A natureza do fragmento iniciador da síntese (*primer*) não é conhecida. O substrato da amido sintase, a forma ativada da glicose, é *adenosina difosfato glicose* (*ADP-glicose*), em vez do UDP-G utilizado pela glicogênio sintase. A produção de ADP-glicose (*ADP-G*) é catalisada pela *ADP-glicose pirofosforilase*:

$$\text{Glicose 1-fosfato} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP-G} + \text{PP}_i$$

Na maioria das plantas superiores, a glicose 1-fosfato é derivada da hidrólise de sacarose, um produto da fotossíntese e a principal forma de transporte de carboidratos das folhas para outros tecidos. ADP-G é substrato da *amido sintase*, a enzima que catalisa a incorporação de glicose ao polímero:

$$\text{ADP-G} + (\text{Amido})_{n\ \text{resíduos de glicose}} \longrightarrow (\text{Amido})_{n+1\ \text{resíduos de glicose}} + \text{ADP}$$

Até recentemente, acreditava-se que a síntese de amido a partir de ADP-G requeria apenas as atividades da sintase e da enzima ramificadora. Todavia, outras enzimas do metabolismo de amido, que pareciam atuar somente na sua degradação, são também importantes na biogênese do grânulo de amido. Tais enzimas são de dois tipos principais: hidrolisam ligações α-1,4 e transferem um segmento linear de uma cadeia para outra e hidrolisam ligações α-1,6 (enzimas desramificadoras). Um novo modelo da síntese de amido propõe um mecanismo descontínuo, que envolve for-

mação de novas ligações e remoção de ligações estabelecidas em posições "erradas"; ou seja, a síntese é acompanhada por um processo de correção.

A organização das cadeias de amilose e amilopectina de modo a formar a estrutura complexa, semicristalina, dos grânulos de amido é ainda obscura.

13.3 METABOLISMO DE SACAROSE E LACTOSE

Sacarose e lactose originam, além de glicose, frutose e galactose

A sacarose da dieta humana constitui uma fonte quantitativamente importante de monossacarídios e, portanto, de energia. A lactose, o principal carboidrato do leite, além de ser fundamental nos primeiros meses de vida, também faz parte da dieta dos adultos, por estar presente nos laticínios. Estes dissacarídios são hidrolisados no intestino delgado por *sacarase* e *lactase*, respectivamente (Fig. 13.6). A sacarose produz glicose e frutose; a lactose libera glicose e galactose; os monossacarídios são, então, absorvidos. A deficiência de lactase ("intolerância à lactose") em indivíduos adultos é relativamente comum. Não sendo hidrolisada, a lactose permanece no intestino delgado, onde sofre fermentação bacteriana, que resulta na produção de gases e ocasiona diarréia.

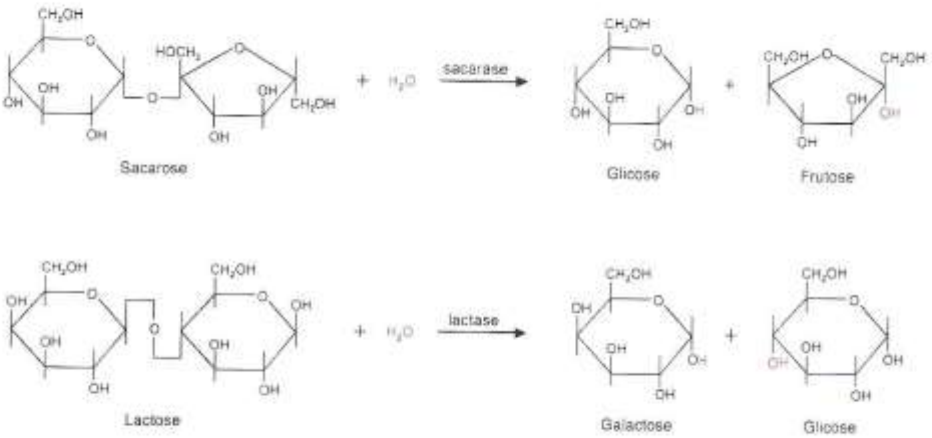


Fig. 13.6 Hidrólise de sacarose e lactose.

Frutose e galactose são metabolizadas, em sua maior parte no fígado, por conversão a intermediários da glicólise (Fig. 13.7).

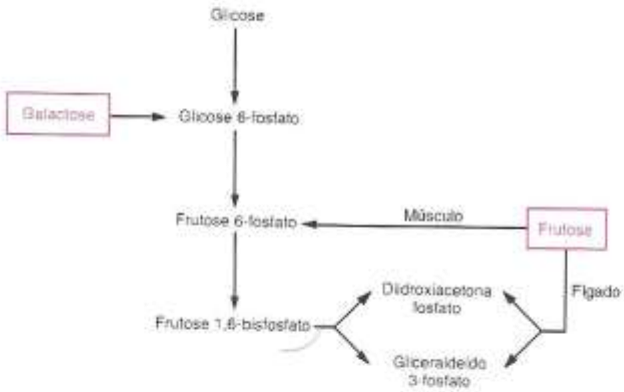


Fig. 13.7 Frutose e galactose são metabolizadas pela via glicolítica.

No fígado, a **frutose** é convertida a diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, pelas seguintes reações:

$$\text{Frutose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{frutoquinase}} \text{Frutose 1-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$

$$\text{Frutose 1-fosfato} \underset{\text{aldolase}}{\overset{\text{frutose 1-fosfato}}{\rightleftharpoons}} \text{Diidroxiacetona fosfato} + \text{Gliceraldeído}$$

$$\text{Gliceraldeído} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{quinase}]{\text{gliceraldeído}} \text{Gliceraldeído 3-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$

A soma destas três reações mostra a transformação de frutose em compostos da via glicolítica:

$$\text{Frutose} + 2\,\text{ATP} \longrightarrow \text{Diidroxiacetona fosfato} + \text{Gliceraldeído 3-fosfato} + 2\,\text{ADP} + 2\,H^+$$

Em outros tecidos, como adiposo e músculo, que sintetizam hexoquinase, a frutose é convertida a frutose 6-fosfato por esta enzima, ganhando acesso à glicólise:

$$\text{Frutose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Frutose 6-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$

Galactose e glicose são *epímeros*, isto é, são açúcares que diferem apenas quanto à configuração de um único átomo de carbono, neste caso o carbono 4. A transformação de uma destas hexoses na outra compreende, entretanto, uma série de reações, uma vez que a epimerização só é feita com os açúcares ligados a UDP:

$$\text{Galactose} + \textbf{ATP} \xrightarrow{\text{galactoquinase}} \text{Galactose 1-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$

$$\text{Galactose 1-fosfato} + \text{UDP-glicose} \underset{\text{uridil transferase}}{\overset{\text{galactose 1-fosfato}}{\rightleftharpoons}} \text{UDP-galactose} + \text{Glicose 1-fosfato}$$

$$\text{UDP-galactose} \underset{\text{epimerase}}{\overset{\text{UDP-galactose}}{\rightleftharpoons}} \text{UDP-glicose}$$

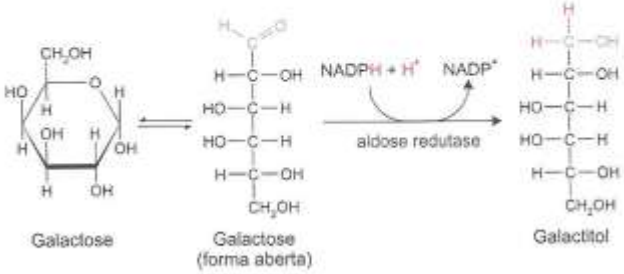
$$\text{Glicose 1-fosfato} \overset{\text{fosfoglicomutase}}{\rightleftharpoons} \text{Glicose 6-fosfato}$$

A soma destas quatro reações é a conversão de galactose em glicose 6-fosfato, que pode ser consumida pela via glicolítica:

$$\text{Galactose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$

A galactosemia resulta do metabolismo anormal da galactose

A deficiência hereditária da *galactose 1-fosfato uridil transferase* provoca uma doença grave, a *galactosemia*, manifestada logo após o nascimento e que leva a desenvolvimento físico e mental retardados. A impossibilidade de converter galactose em glicose leva à utilização daquele açúcar por vias pouco significativas em indivíduos saudáveis, como, por exemplo, a redução a *galactitol*:



O acúmulo de galactitol no cristalino, que tem uma aldose redutase muito ativa, leva à catarata. Os efeitos da moléstia podem ser evitados suprimindo precocemente a lactose da dieta. O diagnóstico, que, portanto, também deve ser precoce, é feito pela dosagem de galactose 1-fosfato uridil transferase nos glóbulos vermelhos.

BIBLIOGRAFIA

Graya RGF: Inborn errors of metabolism as a cause of neurological disease in adults: an approach to investigation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**:5-12, 2000.

Krssak M et al: Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes* **53**:3048-3056, 2004.

Myers AM et al: Recent progress in understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* **122**:989-998, 2000.

Nakamura Y: Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol* **43**(7):718-725, 2002.

Roden M, Bernroider E: Hepatic glucose metabolism in humans — its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **17**(3):365-383, 2003.

Scriver CR et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.

Smythe C, Cohen P: The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem* **200**(3):625-631, 1991.

Taylor R et al: Direct assessment of liver glycogen storage by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects. *J Clin Invest* **97**:126-132, 1996.

14

Gliconeogênese

14.1 ORIGEM DA GLICOSE CIRCULANTE EM ANIMAIS SUPERIORES

A maioria das células de animais superiores é capaz de suprir suas necessidades energéticas a partir da oxidação de vários tipos de compostos: açúcares, ácidos graxos, aminoácidos. Alguns tecidos e células desses organismos, entretanto, utilizam exclusivamente glicose como fonte de energia (Tabela 14.1). Este é o caso do cérebro, que consome aproximadamente 120 g de glicose por dia, e das hemácias, que necessitam, em média, de 30 g diários. A oxidação de glicose pelo cérebro corresponde a cerca de 75% do total de glicose oxidada por dia por um ser humano adulto, independentemente da atividade mental desempenhada. Para que este suprimento seja ininterrupto, o organismo dispõe de mecanismos destinados a manter a oferta de glicose circulante, possibilitando sua captação contínua por aqueles tipos de célula, mesmo em tempos afastados da ingestão de refeições. À medida que vai diminuindo a concentração de glicose circulante derivada diretamente da absorção dos alimentos, a degradação crescente do glicogênio hepático mantém a concentração adequada de glicose sangüínea. No entanto, a reserva hepática de glicogênio é limitada e insuficiente para manter níveis glicêmicos normais além de 8 horas de jejum. Após este período, a contribuição da reserva de glicogênio decresce, ao mesmo tempo em que é acionada uma outra via metabólica de produção de glicose. Esta outra via, que se processa no fígado e nos rins, é a *gliconeogênese*. Como seu nome indica, a glico*neo*gênese consiste na síntese de glicose a partir de compostos que não são carboidratos: *aminoácidos, lactato* e *glicerol*.

Tabela 14.1 Fonte de energia para diferentes tecidos

Tecido	Composto		
	Glicose	Ácidos graxos	Corpos cetônicos
Cérebro[1]	+		
Hemácias e leucócitos	+		
Medula renal	+		
Retina	+		
Mucosa intestinal	+		
Fígado	+	+	
Adiposo	+	+	
Músculos esqueléticos e cardíaco	+	+	+
Córtex renal	+	+	+

[1]O cérebro, no jejum prolongado, torna-se capaz de oxidar corpos cetônicos.

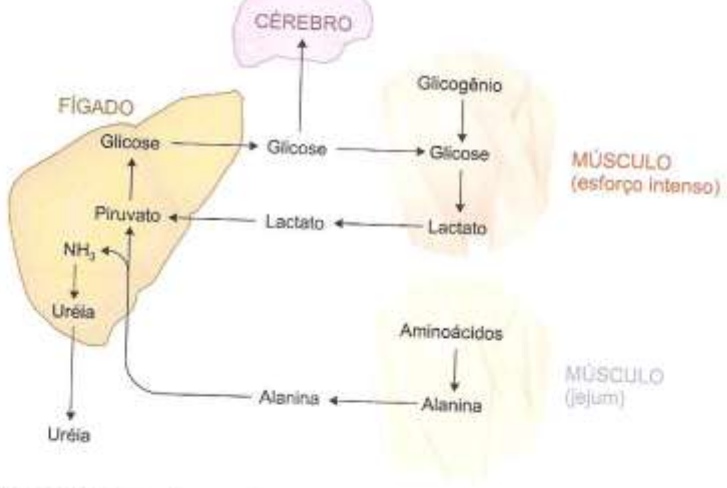


Fig. 14.1 Relação entre diferentes órgãos na gliconeogênese — esta via ocorre no fígado a partir de substratos produzidos pelo músculo: lactato no esforço intenso e alanina no jejum; o lactato origina-se, ainda, de hemácias. A maior parte da glicose sintetizada destina-se ao cérebro.

Os precursores mais importantes de glicose nos animais são os ***aminoácidos*** — todos os aminoácidos, com exceção de lisina e leucina, podem originar glicose: são os *aminoácidos glicogênicos*. A degradação de lisina e leucina produz somente acetil-CoA, como acontece com os ácidos graxos, e os animais são incapazes de sintetizar glicose a partir de acetil-CoA. Os aminoácidos são provenientes da degradação de proteínas endógenas, fundamentalmente as musculares, durante o jejum. No músculo, e em outros tecidos, os aminoácidos são convertidos a alanina e glutamina, suas principais formas de transporte. O ***lactato*** origina-se dos músculos submetidos a contração intensa e de outras células que degradam glicose anaerobiamente — hemácias, medula renal, retina etc. No fígado e nos rins, alanina, glutamina e lactato convertem-se em piruvato, que origina glicose pela gliconeogênese; o grupo amino dos aminoácidos é excretado como uréia (Fig. 14.1). O ***glicerol***, derivado da hidrólise de triacilgliceróis do tecido adiposo durante o jejum, tem pequena importância quantitativa na produção de glicose.

O fígado é o principal órgão responsável pela gliconeogênese; quanto aos rins[1], acreditava-se, até alguns anos atrás, que dariam uma contribuição significativa apenas no jejum muito prolongado. Novas evidências clínicas e bioquímicas indicam que a gliconeogênese renal é uma fonte importante de glicose em períodos menores de jejum, como o jejum noturno.

14.2 REAÇÕES DA GLICONEOGÊNESE

A gliconeogênese utiliza as reações reversíveis da glicólise e substitui por outras as reações irreversíveis

A transformação de alanina e lactato em glicose inicia-se por sua conversão a piruvato. A alanina origina piruvato por ação da *alanina aminotransferase*; o lactato é convertido a piruvato por ação da lactato desidrogenase. A transformação de piruvato em glicose pela gliconeogênese processa-se no sentido oposto ao da glicólise (Fig. 9.5, Seção 9.1), utilizando quase todas as suas enzimas, com exceção daquelas que catalisam reações irreversíveis — piruvato quinase, fosfofrutoquinase 1 e glicoquinase. Estas reações são contornadas por meio de ***outras*** reações, catalisadas, naturalmente, por ***outras*** enzimas. As três etapas em que a gliconeogênese difere da glicólise — etapas 1 a 3 — serão analisadas a seguir.

[1]Em relação ao metabolismo de carboidratos, deve-se ressaltar a atuação distinta de dois componentes do rim: a *medula renal* oxida glicose a lactato pela glicólise e o *córtex renal* efetua a gliconeogênese a partir de lactato, glutamina etc.

Etapa 1. Conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato

A reação catalisada pela *piruvato quinase* (Fosfoenolpiruvato + ADP → Piruvato + ATP) é substituída por duas reações, catalisadas pela *piruvato carboxilase* (1) e pela *fosfoenolpiruvato carboxiquinase* (2):

$$\text{Piruvato} + CO_2 + H_2O + ATP \longrightarrow \text{Oxaloacetato} + ADP + P_i + 2H^+ \quad (1)$$

$$\text{Oxaloacetato} + GTP \rightleftharpoons \text{Fosfoenolpiruvato} + CO_2 + GDP \quad (2)$$

Para ser utilizado como substrato da piruvato carboxilase, uma enzima mitocondrial, o piruvato produzido no citossol entra na mitocôndria por ação da piruvato translocase. A piruvato carboxilase contém *biotina* (vitamina B_7), como grupo prostético. A biotina combina-se com CO_2 à custa de ATP e promove a carboxilação do piruvato, produzindo oxaloacetato (Fig. 14.2). O oxaloacetato passa para o citossol pela lançadeira do malato-aspartato e, por ação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, é convertido a fosfoenolpiruvato, por descarboxilação e fosforilação à custa de GTP (Fig. 14.3). Em alguns organismos, como os seres humanos, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase localiza-se também na mitocôndria — o fosfoenolpiruvato formado na organela é transportado para o citossol pela tricarboxilato translocase.

O fosfoenolpiruvato produzido nesta etapa é transformado em frutose 1,6-bisfosfato pelas enzimas que também compõem a glicólise, que, como catalisam reações reversíveis, podem operar a via no sentido inverso.

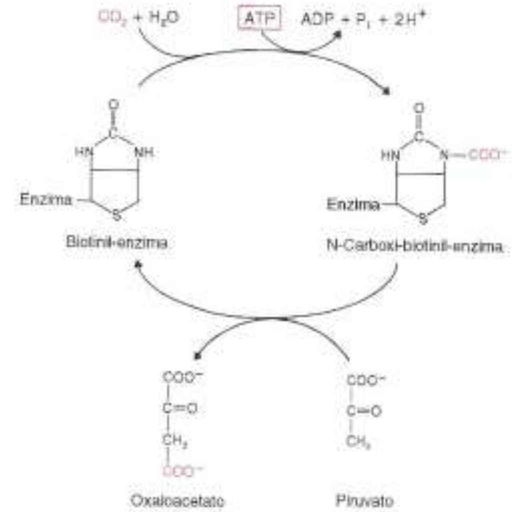


Fig. 14.2 Carboxilação de piruvato formando oxaloacetato: o ATP é consumido na carboxilação da biotina, que transfere o grupo $-COO^-$ para o piruvato.

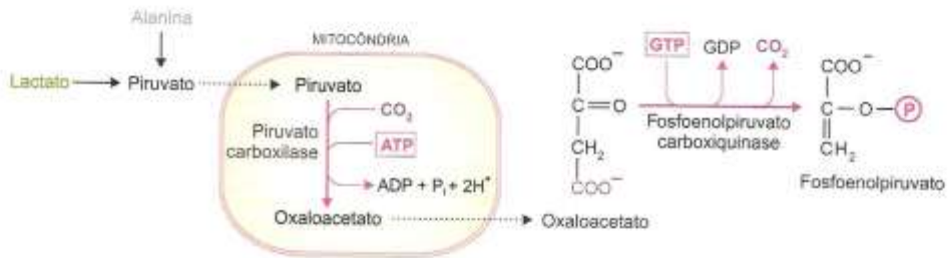


Fig. 14.3 A conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato compreende o transporte de piruvato para a mitocôndria, sua carboxilação a oxaloacetato, a transferência de oxaloacetato para o citossol e a transformação deste composto em fosfoenolpiruvato. As setas tracejadas indicam transporte por translocases. Nos casos em que a conversão de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato ocorre dentro da mitocôndria, o próprio fosfoenolpiruvato é transportado para o citossol.

Etapa 2. Conversão de frutose 1,6-bisfosfato a frutose 6-fosfato

Em lugar da reação irreversível catalisada pela fosfofrutoquinase 1, ocorre uma reação de hidrólise do grupo fosfato do carbono 1, catalisada pela *frutose 1,6-bisfosfatase*.

$$\text{Frutose 1,6-bisfosfato} + H_2O \longrightarrow \text{Frutose 6-fosfato} + P_i$$

A frutose 6-fosfato pode ser isomerizada a glicose 6-fosfato pela fosfoglicoisomerase.

Etapa 3. Conversão de glicose 6-fosfato a glicose

Para contornar a irreversibilidade da reação catalisada pela glicoquinase, esta reação é trocada por uma reação de hidrólise do grupo fosfato ligado ao carbono 6, catalisada pela *glicose 6-fosfatase*. É, portanto, uma reação semelhante à anterior.

$$\text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{Glicose} + P_i$$

O produto da reação, a *glicose*, ao contrário da glicose fosforilada, pode atravessar livremente a membrana plasmática. A glicose 6-fosfatase ocorre ***exclusivamente*** em fígado e rins e é graças à sua presença que estes órgãos, principalmente o fígado, podem exportar glicose para corrigir a glicemia.

O glicerol, para ser usado como composto gliconeogênico, é fosforilado a glicerol 3-fosfato, que é oxidado a diidroxiacetona fosfato. Este é um composto da via glicolítica e pode, portanto, prosseguir em direção à glicose pelas reações da glicólise e as substitutivas (frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase). A Fig. 14.4 apresenta um esquema geral da gliconeogênese.

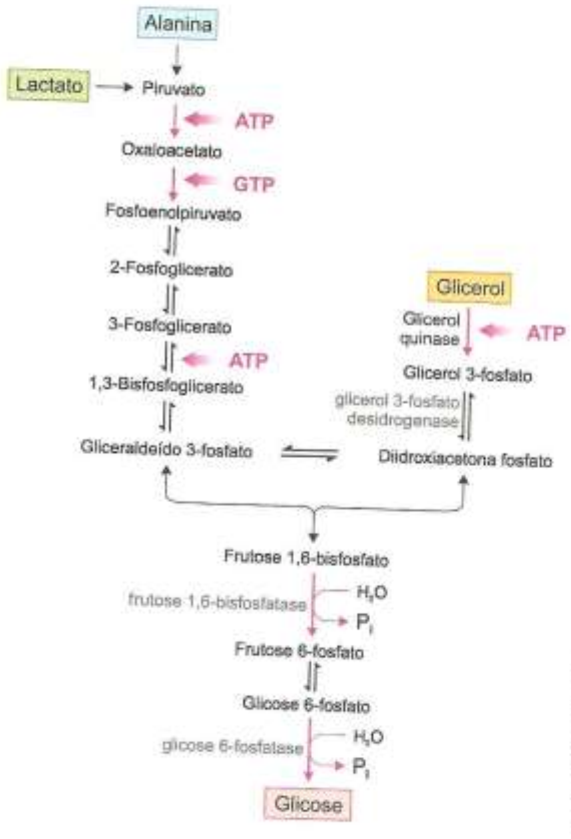


Fig. 14.4 Esquema simplificado da gliconeogênese. As reações que convertem piruvato a oxaloacetato e este a fosfoenolpiruvato estão detalhadas na Fig. 14.3. As reações comuns à via glicolítica podem ser encontradas na sua forma completa na Fig. 9.5 (Seção 9.1). Deve-se ressaltar que são necessárias *duas* moléculas de cada um dos compostos gliconeogênicos — alanina, lactato, glicerol — para sintetizar *uma* molécula de glicose.

14.3 BALANÇO ENERGÉTICO DA GLICONEOGÊNESE

A gliconeogênese é uma síntese, pois utiliza um precursor de três carbonos e tem como produto final um composto de seis carbonos, a glicose. Como todas as sínteses, é um processo que consome energia, sob a forma de ATP. De fato, para cada molécula de glicose formada a partir de duas moléculas de piruvato são necessários 6 ATP, utilizados nas reações catalisadas por piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (que, na verdade, usa GTP, mas para o balanço energético pode ser computado como ATP) e fosfoglicerato quinase (Fig. 14.4).

A equação geral da gliconeogênese a partir de piruvato é:

$$2\ \text{Piruvato} + 6\ \text{ATP} + 6\ H_2O + 2\ \text{NADH} \longrightarrow \text{Glicose} + 6\ \text{ADP} + 6\ \text{Pi} + 2\ \text{NAD}^+ + 2\ H^+$$

Se o composto inicial for o lactato, a equação transforma-se em:

$$2\ \text{Lactato} + 6\ \text{ATP} + 6\ H_2O \longrightarrow \text{Glicose} + 6\ \text{ADP} + 6\ \text{Pi} + 4\ H^+$$

No caso do glicerol, a síntese de uma molécula de glicose consome apenas 2 ATP na reação catalisada pela glicerol quinase.

Os hepatócitos, portanto, consomem ATP para fornecer glicose aos tecidos que dela dependem. Nas condições em que a gliconeogênese está ativada, a obtenção de ATP pelos hepatócitos provém da oxidação de ácidos graxos.

14.4 DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS E GLICONEOGÊNESE

A degradação de proteínas é um processo normal

A utilização de aminoácidos para a gliconeogênese não é um processo excepcional, que ocorra em condições extremas, mas uma via metabólica habitual que opera quotidianamente, contribuindo para a manutenção da glicemia durante o jejum noturno. Não é, portanto, verdadeira a idéia difundida de que a degradação de proteínas com finalidade de obter energia só se processa quando estão esgotadas as reservas de carboidratos e de lipídios, após jejum prolongado. Nem poderia ser diferente, uma vez que a reserva de carboidratos é pequena e *os mamíferos não dispõem de vias capazes de transformar os ácidos graxos, principais constituintes da reserva lipídica, em glicose.*

Os ácidos graxos habitualmente presentes nos alimentos e nas reservas lipídicas são moléculas lineares e de número par de átomos de carbono. Na sua degradação, estes ácidos graxos (ou seja, a grande maioria dos ácidos graxos) são convertidos a acetil-CoA e *não há vias de conversão de acetil-CoA a glicose nos mamíferos*. A exceção está nos ácidos graxos de número ímpar de carbonos ou contendo ramificações na sua molécula, que, quando oxidados, originam, além de acetil-CoA, propionil-CoA. Este composto pode ser transformado em succinil-CoA, um intermediário do ciclo de Krebs, que pode, portanto, gerar glicose. A contribuição desses ácidos graxos para a gliconeogênese, no entanto, é *bastante pequena*, pela sua pouca representatividade nas dietas e, principalmente, por não serem armazenados como tais pelos mamíferos. Vegetais e bactérias é que são capazes de sintetizar glicose a partir de ácidos graxos, por possuírem as enzimas do ciclo do glioxilato, *ausente nos mamíferos*.

Assim, a degradação de proteínas e a utilização de seus aminoácidos para a gliconeogênese é um processo fisiológico normal, acionado precocemente, antes mesmo que a reserva hepática de glicogênio torne-se insuficiente para a manutenção da glicemia.

A glicólise e a gliconeogênese são vias praticamente opostas, compartilhando a maioria de suas enzimas. Para que haja um ganho líquido é, portanto, imprescindível que uma das vias funcione enquanto a outra está inativa. De fato, ***as atividades destas duas vias são inversamente reguladas, como será analisado no Capítulo 20.***

BIBLIOGRAFIA

Boden GJ: Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. *Investig Med* **52**(6):375-378, 2004.
Cano N: Bench-to-bedside review: glucose production from the kidney. *Crit Care* **6**(4):317-321, 2002.
De Feo P et al: Metabolic response to exercise. *J Endocrinol Invest* **26**(9):851-854, 2003.
Van Schaftingen E, Gerin I: The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* **362**:513-532, 2002.

15

Fotossíntese

Para o desempenho de suas funções, os seres vivos utilizam, fundamentalmente, a energia química contida nas moléculas de ATP e uma fonte de poder redutor, papel cumprido pelo NADPH. As sínteses de ATP, a partir de ADP e P_i, e de NADPH, a partir de $NADP^+$ e ($H^+ + e^-$), são sempre obtidas por oxidação, ou seja, dependem da geração de elétrons de alta energia, e nisto todos os organismos se assemelham. Diferem, entretanto, quanto à energia utilizada para a obtenção desses elétrons, que pode ser *luminosa* ou *química*. Segundo este critério, os organismos podem ser separados em dois grandes grupos: os *fototróficos*, que produzem ATP e NADPH utilizando a energia luminosa (organismos que fazem fotossíntese), e os *quimiotróficos*, que os sintetizam aproveitando a energia gerada pela oxidação de compostos químicos, orgânicos ou inorgânicos (ver Capítulo 8).

A designação *fototróficos* precisa ser claramente compreendida, uma vez que tais organismos não prescindem de um composto oxidável — mesmo quando os elétrons são emitidos por absorção de radiação luminosa, a oxidação de um composto inorgânico (H_2O, H_2S, H_2 etc.) ou orgânico (ácidos, álcoois etc.) é sempre a fonte primária de elétrons. Tanto nos organismos fototróficos como nos quimiotróficos, os elétrons provenientes dos compostos oxidados são transferidos para transportadores de elétrons, gerando um gradiente de prótons cuja energia potencial é utilizada para produzir ATP. Os elétrons originários das substâncias oxidadas são ainda doados para $NADP^+$, formando NADPH.

A *fotossíntese* é o processo pelo qual a energia luminosa é transformada em energia química, sob a forma de ATP, NADPH e carboidratos. Os organismos capazes de efetuar este processo são as bactérias verdes e púrpuras, as cianobactérias, as algas e as plantas. O processo é apropriadamente denominado foto*síntese* porque as coenzimas produzidas, ATP e NADPH, são utilizadas para adicionar CO_2 a moléculas orgânicas, caracterizando uma síntese de *carboidrato*. A incorporação de CO_2 a compostos orgânicos não é um processo exclusivo de células fotossintéticas. Ao contrário, tem ocorrência generalizada em outras células, incluindo as dos animais: por meio de reações de carboxilação, o piruvato origina oxaloacetato, a acetil-CoA produz malonil-CoA etc. A síntese de moléculas orgânicas também é um processo celular trivial, qualquer que seja a célula considerada. Os animais são capazes, por exemplo, de sintetizar glicose a partir de aminoácidos ou lactato (gliconeogênese) e de sintetizar macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e glicogênio, a partir de moléculas precursoras pequenas. Em todos estes casos, entretanto, a energia (ATP e NADPH) empregada é sempre derivada da oxidação de compostos orgânicos, com liberação de CO_2, de tal maneira que, no saldo final, *nunca* há incorporação líquida de CO_2. Nos organismos fotossintéticos, por outro lado, as coenzimas ATP e NADPH consumidas na incorporação de CO_2 são obtidas com a utilização da energia luminosa e de doadores de elétrons do meio, havendo aumento *real* da massa de compostos orgânicos. Estes seres, por poderem viver à custa de CO_2 como única fonte de carbono, são designados *autotróficos*. Os organismos que não fazem fotossíntese dependem dos autotróficos para a obtenção de carbono na forma de compostos orgânicos, razão pela qual são designados *heterotróficos*.

Como os organismos heterotróficos dependem da energia química presente nos compostos produzidos pelos seres autotróficos fotossintéticos, é possível afirmar que a energia consumida pelos sistemas biológicos deriva primariamente da energia solar. Ainda mais, na fotossíntese levada a cabo por muitos organismos, a energia luminosa é aproveita-

da para acoplar a formação de O_2 à fixação de CO_2. Em resumo, a fotossíntese contribui simultaneamente para gerar uma atmosfera aeróbia e uma fonte de energia prontamente utilizável, dois fatores fundamentais para a manutenção da vida no planeta.

15.1 FOTOSSÍNTESE *VERSUS* OXIDAÇÃO DA GLICOSE

A equação geral da fotossíntese em muitos organismos é

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +2.870\ kJ \cdot mol^{-1}$$

Esta equação é o inverso da equação de oxidação total da glicose, que ocorre em todas as células aeróbias:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -2.870\ kJ \cdot mol^{-1}$$

Entretanto, deve ser ressaltado que a fotossíntese *não* é o inverso da oxidação de glicose a CO_2 e H_2O e que os dois processos têm, na realidade, vários aspectos comuns.

A equação geral da fotossíntese, como qualquer equação geral, é a tradução de um processo extremamente complexo em uma equação química simplificada. O valor do $\Delta G^{\circ\prime}$ (ou da constante de equilíbrio, da ordem de 10^{-500}) revela a inviabilidade espontânea desta síntese. A produção de glicose a partir de CO_2 e H_2O só é possível nos organismos que desenvolveram sistemas que lhes permitem utilizar a energia luminosa para atender o enorme gasto de energia que viabiliza o processo.

Uma comparação esquemática entre a oxidação aeróbia de glicose e a fotossíntese está apresentada na Fig. 15.1. Nos dois processos, são gerados elétrons de alta energia — à custa da *energia química* das reações de óxido-redução no caso da degradação da glicose e à custa da *energia luminosa* na fotossíntese — que são doados para cadeias de transporte de elétrons. Na oxidação da glicose, o doador inicial de elétrons, eles ficam sob a forma de uma coenzima reduzida, NADH principalmente, que os entrega à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, cujo aceptor final é o oxigênio, que é reduzido a água. Nas cadeias de transporte de elétrons integrantes da fotossíntese, o doador inicial de elétrons é a água e o aceptor final, a coenzima $NADP^+$, que é reduzida a NADPH; o oxigênio é um dos produtos do processo. Em ambos os casos, o transporte de elétrons origina um gradiente de prótons, a partir do qual o ATP é sintetizado.

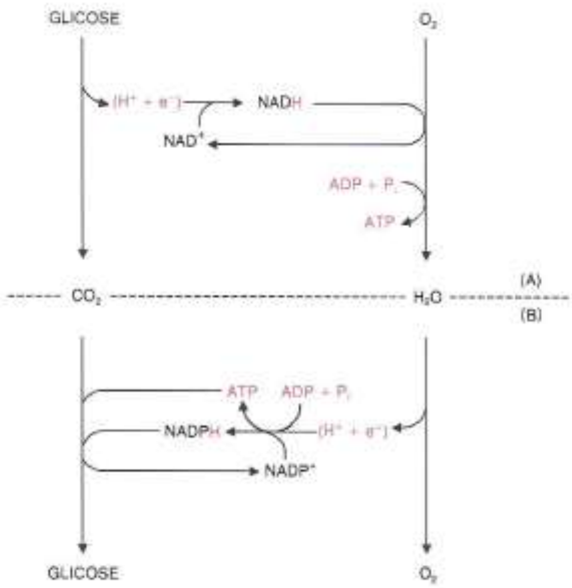


Fig. 15.1 Esquema comparativo entre a oxidação completa da glicose (A) e a sua síntese pela fotossíntese (B).

A utilização da água como agente redutor significou um avanço evolutivo da capacidade fotossintética

Acredita-se que, nos estágios mais primitivos da evolução, as células viviam em um meio rico, de composição variada, mas sem oxigênio. Obtinham energia por metabolismo anaeróbio, oxidando parcialmente compostos orgânicos disponíveis no meio, à semelhança das fermentações de açúcares atuais. A partir de fermentação eram produzidos ATP e poder redutor (NADH ou NADPH), utilizados em seu metabolismo; álcoois e ácidos orgânicos resultantes das fermentações eram excretados para o meio. Em um estágio posterior da evolução, a escassez crescente de material orgânico prontamente fermentável favorecia a utilização de uma fonte de carbono alternativa. Uma fonte provável, devido à sua abundância no meio, era o *gás carbônico*, que poderia ser convertido em moléculas orgânicas. Todavia, para esta transformação, eram necessários redutores potentes como NADH e NADPH, que não estavam mais sendo produzidos por fermentação; ainda mais, os doadores de hidrogênio disponíveis — ácidos orgânicos originados de fermentação, H_2S, H_2 etc. — tinham um poder redutor insuficiente para a fixação do CO_2. Todas estas condições propiciaram o desenvolvimento de um mecanismo que utilizasse a energia luminosa para transferir ($H^+ + e^-$) de um composto reduzido presente no meio para o $NAD(P)^+$ formando NAD(P)H, capaz de reduzir o CO_2. Em outras palavras, estas condições permitiram o aparecimento das primeiras bactérias fotossintéticas.

Essas bactérias, que originaram as bactérias verdes e púrpuras atuais, desenvolveram um aparelho fotossintético simples, composto de um fotossistema capaz de captar luz, tornando-se excitado, isto é, passando a ter um elétron de alta energia que podia ser transferido a uma coenzima (NAD^+ ou $NADP^+$). Como conseqüência desta transferência, a molécula que havia captado a energia luminosa ficava com deficiência de um elétron, ou seja, ficava oxidada; para que o processo pudesse prosseguir, era necessária a existência, no meio ambiente, de um redutor capaz de repor o elétron (Fig. 15.2). A sobrevivência dessas bactérias estava, então, restrita aos locais onde havia disponibilidade desse redutor (H_2S, H_2 etc.).

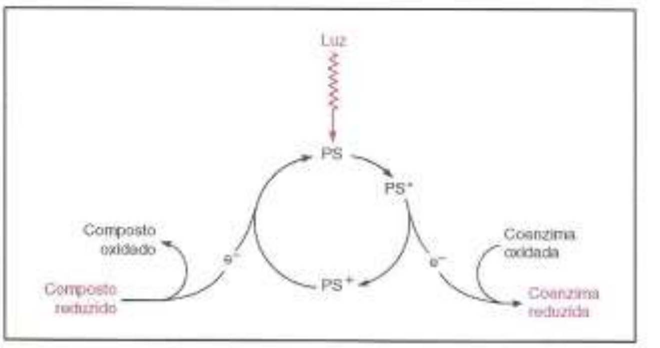


Fig. 15.2 Funcionamento de um fotossistema simples (PS) que, por absorção de luz, torna-se excitado (PS*) e emite elétrons (e^-), recebidos por uma coenzima; o fotossistema oxidado (PS^+) recupera sua forma original recebendo elétrons de um composto redutor presente no meio.

Foram as cianobactérias os primeiros organismos a se libertarem do uso de redutores específicos, ao desenvolverem um aparelho fotossintético capaz de utilizar um redutor abundante: a *água*. De fato, a água pode ser usada como um redutor, originando quatro prótons e quatro elétrons e liberando oxigênio molecular; os elétrons e prótons são usados na redução de $NADP^+$. A equação geral do processo pode ser desmembrada em duas etapas:

$$\begin{array}{l} 2\,H_2O \longrightarrow 4\,(H^+ + e^-) + O_2 \\ 2\,NADP^+ + 4\,(H^+ + e^-) \longrightarrow 2\,NADPH + 2\,H^+ \\ \hline 2\,H_2O + 2\,NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} 2\,NADPH + 2\,H^+ + O_2 \end{array}$$

A fotossíntese trouxe modificações profundas para a composição da atmosfera terrestre primitiva. O ambiente, antes desprovido de oxigênio, era fortemente redutor. Gradativamente foi tornando-se oxidante, criando condições propícias para o metabolismo aeróbio e, portanto, para o desenvolvimento dos animais.

Neste capítulo, será inicialmente descrita a fotossíntese que se processa em plantas (Seções 15.3 a 15.6) e, posteriormente, a fotossíntese bacteriana (Seção 15.7). Antes, porém, da análise do próprio processo fotossintético, será apresentada uma breve descrição das estruturas celulares e dos compostos diretamente relacionados com este processo.

15.2 ABSORÇÃO DE LUZ: FOTOSSISTEMAS

A fotossíntese ocorre em organelas especiais

Nos eucariotos (algas e plantas superiores), a fotossíntese processa-se em organelas especializadas: os *cloroplastos* (Fig. 15.3), presentes nas células em número que varia de 1 a 1.000. Estas organelas são compostas de duas membranas: uma externa, bastante permeável, e uma interna, com permeabilidade seletiva. O conteúdo do cloroplasto, análogo à matriz mitocondrial, é chamado *estroma*. Imersa no estroma encontra-se a *membrana tilacóide*, que delimita um compartimento denominado *tilacóide*, cujo lúmen fica isolado do estroma. A membrana tilacóide apresenta múltiplos dobramentos, que se empilham formando os *grana*, e também segmentos não dobrados. A membrana tilacóide contém os pigmentos fotossintéticos, associados a proteínas integradas, e as enzimas necessárias para a utilização da luz e a síntese de ATP e NADPH. No estroma, encontram-se as enzimas que catalisam a redução de CO_2 a carboidrato.

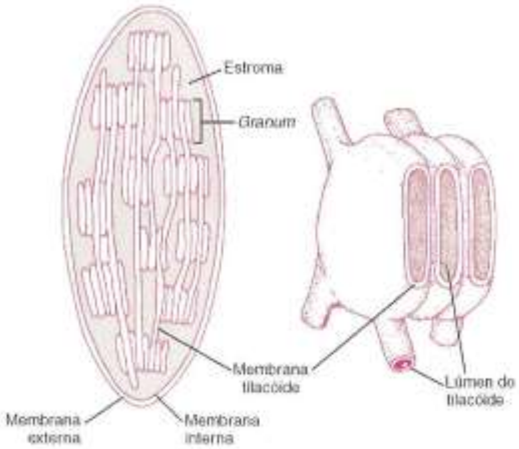


Fig. 15.3 Estrutura simplificada de um cloroplasto. A membrana tilacóide apresenta segmentos lineares e segmentos dobrados; os dobramentos empilham-se, assemelhando-se a vesículas achatadas, formando os *grana*. A figura mostra, à direita, um *granum* seccionado para evidenciar o lúmen do tilacóide, o compartimento delimitado pela membrana tilacóide. Reproduzida com modificações de Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., 1983.

Os pigmentos fotossintéticos efetuam a absorção da energia luminosa e podem ser de três tipos principais: clorofilas, carotenóides e ficobilinas.

As *clorofilas* são as moléculas fotorreceptoras mais importantes. São compostos derivados da protoporfirina IX (Seção 3.2), como o grupo heme. Nas clorofilas (Fig. 15.4) os átomos de nitrogênio dos quatro núcleos pirrólicos estão ligados a um íon Mg^{2+}, que ocupa a mesma posição central que o íon Fe^{2+} no heme; um dos anéis (IV) é reduzido e aparece um anel adicional (V), não pirrólico; a longa cadeia hidrofóbica do álcool fitol (C_{20}) está esterificada à carboxila do substituinte do anel IV. Nos cloroplastos das células vegetais superiores, há dois tipos principais de clorofila, *a* e *b*, que diferem pelo substituinte do anel II: metila na *clorofila a* e formila na *clorofila b*. As bacterioclorofilas (tipos *a* e *b*) distinguem-se das clorofilas das plantas quanto ao substituinte do anel I e à redução do anel II.

Dentre os carotenóides, pigmentos alaranjados, estão os *carotenos*, dos quais o mais importante é o β-caroteno (Fig. 15.5), e as *xantofilas*, que são carotenos oxigenados. O β-caroteno é precursor da vitamina A nos mamíferos.

As algas apresentam ainda pigmentos chamados *ficobilinas*, que são cadeias lineares formadas por núcleos tetrapirrólicos.

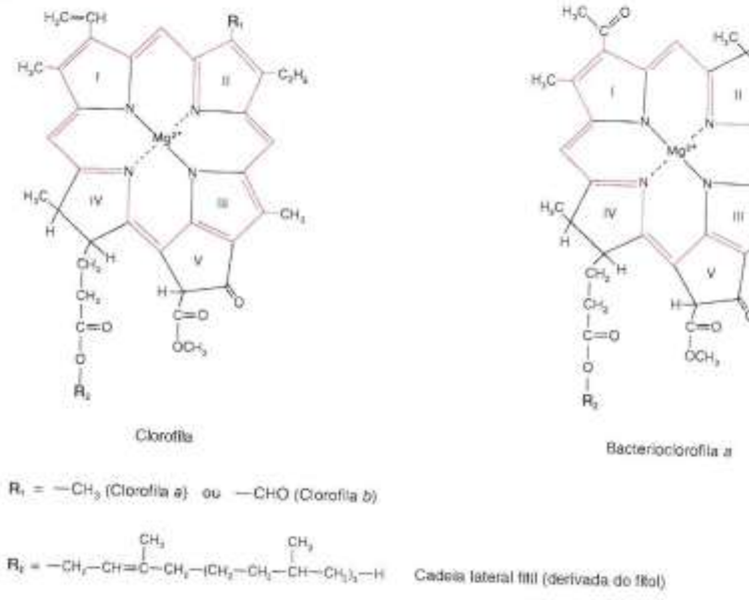


Fig. 15.4 Estruturas da clorofila *a* e *b* e da bacterioclorofila *a*. Os sistemas de ligações conjugadas (ligações simples e duplas alterna-das), responsáveis pela absorção de luz, estão assinalados em vermelho.

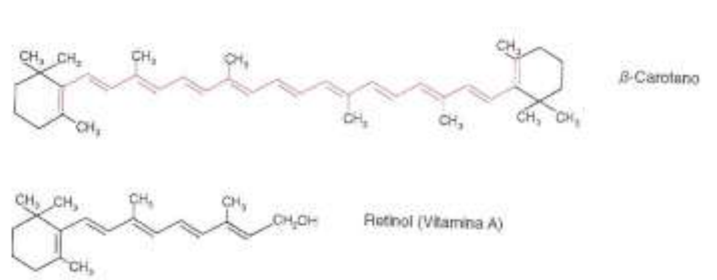


Fig. 15.5 Estrutura do β-caroteno que, como as clorofilas e outros pigmentos fotossintéticos, apresenta alternância de ligações sim-ples e duplas, mostradas em vermelho. Nos mamíferos, é precursor da vitamina A.

A absorção de luz pode resultar em emissão de elétrons

A radiação luminosa tem dois componentes: uma onda eletromagnética e um fluxo de partículas de luz, os *fótons*. A quantidade de energia de cada fóton, o *quantum*, depende do comprimento de onda da radiação luminosa e é express[a] pela lei de Planck:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c/\lambda$$

onde h é a constante de Planck ($6{,}62 \times 10^{-34}$ J · s) e ν, a freqüência da radiação, igual à razão c/λ, entre a velocidade da luz (c) e o comprimento de onda (λ). A equação mostra que quanto menor o comprimento de onda, maior a quan-tidade de energia dos fótons. Assim, radiações ultravioleta, com pequeno comprimento de onda ($\lambda < 400$ nm) e alta freqüência, têm energia suficiente para romper ligações covalentes. A maior parte desta fração da energia luminosa é impedida de atingir a superfície terrestre por ser bloqueada pela camada de ozônio. Radiações infravermelhas, com grande comprimento de onda ($\lambda > 750$ nm) e baixa freqüência, têm energia apenas para estimular as vibrações mole-culares, ou seja, produzir calor. A radiação utilizada pela fotossíntese, na maioria dos organismos, situa-se no espectro da luz visível, com comprimentos de onda entre 400 e 700 nm.

A propriedade de absorver luz depende do arranjo dos elétrons de uma molécula. Moléculas contendo ligações conjugadas (ligações simples e duplas alternadas, ver Figs. 15.4 e 15.5), como as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas, são capazes de absorver luz visível. Ao absorver um fóton, uma molécula passa a um estado excitado, que é instável. A volta ao estado fundamental é extremamente rápida, completando-se em tempos da ordem de 10^{-11} a 10^{-8} segundo. Neste retorno ao estado fundamental, a energia absorvida pode ser dissipada de quatro formas diferentes: (1) sendo convertida a energia cinética, isto é, calor; (2) por emissão de luz, ou seja, fluorescência; (3) a energia de excitação passa de uma molécula para outra; (4) o próprio elétron da molécula excitada passa para uma molécula vizinha, ou seja, ocorre fotoxidação. Os dois últimos processos são fundamentais para a fotossíntese.

Os pigmentos receptores de luz estão organizados em fotossistemas

Os pigmentos que absorvem luz fazem parte de complexos proteicos embebidos na membrana tilacóide, chamados *fotossistemas*, que são as unidades funcionais das reações da fotossíntese que dependem de luz. Cada fotossistema pode conter centenas de moléculas de clorofila, carotenóides e ficobilinas, todas capazes de absorver energia luminosa, sendo, por isto, chamadas de *moléculas-antena*. Os carotenóides e as ficobilinas apresentam absorção em regiões do espectro luminoso em que as clorofilas absorvem pouco, fazendo expandir a faixa do espectro luminoso efetivamente utilizado para a fotossíntese. Os pigmentos fotorreceptores ficam "pendurados" nas subunidades proteicas constituintes dos fotossistemas, assumindo uma disposição espacial que torna muito eficiente a propagação da energia absorvida. A energia luminosa coletada pelos pigmentos-antena é transmitida, de molécula a molécula, até atingir o *centro de reação* (Fig. 15.6), uma das formas descritas de dissipar a energia absorvida, a de número 3. As transferências são muito rápidas, completando-se o trajeto em tempos da ordem de 10^{-10} s. O centro de reação é constituído por duas moléculas de clorofila *a* chamadas *par especial*, ligadas a subunidades do fotossistema. O que torna estas moléculas especiais é o fato de sofrerem fotoxidação, emitindo elétrons (a forma número 4 de dissipação de energia), que são transferidos para compostos transportadores de elétrons. A molécula de clorofila *a* capaz de emitir elétrons é quimicamente idêntica às outras, mas adquire esta propriedade especial talvez pelo meio em que se situa ou pelo tipo de proteína à qual está associada.

Estão presentes na membrana tilacóide dois tipos de fotossistemas (*PS* de *photosystem*): fotossistema I (*PSI*) e fotossistema II (*PSII*). Cada um deles, como já assinalado, é um complexo proteico transmembranar contendo o centro de reação, as moléculas-antena e transportadores de elétrons. O centro de reação do fotossistema é designado segundo o



Fig. 15.6 Disposição dos pigmentos fotorreceptores no fotossistema I (os demais componentes do fotossistema foram omitidos). As centenas de moléculas-antena (clorofilas e carotenóides) transferem a energia que absorvem quando iluminadas para o centro de reação, onde se situam as moléculas de clorofila capazes de sofrer fotoxidação, o par especial. Processo semelhante ocorre no fotossistema II. Reproduzida de Lehninger, A. L. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, 1982.

comprimento de onda de absorção máxima do par de moléculas de clorofila que o constitui: o de PSI é designado *P700* — *P* de *Pigmento* e *700* porque sua absorbância máxima dá-se em comprimento de onda igual a 700 nm — e o de PSII é denominado *P680* por absorver mais em comprimento de onda igual a 680 nm.

15.3 FOTOSSÍNTESE EM VEGETAIS: FASE CLARA

A fase clara da fotossíntese produz O_2, NADPH e ATP

É costume dividir a fotossíntese vegetal em duas fases: a *fase clara*, em que a luz solar é utilizada para síntese de ATP e NADPH na membrana tilacóide, e a *fase escura*, em que ATP e NADPH produzidos na fase clara são utilizados para a fixação de CO_2 no estroma do cloroplasto. Esta denominação para as etapas da fotossíntese é inadequada, porque mecanismos reguladores determinam que a chamada "fase escura" também seja dependente de luz (Seção 15.5).

A fase clara inicia-se com a absorção de fótons por moléculas-antena e transferência da excitação para moléculas adjacentes, até atingir um centro de reação. O centro de reação, excitado, emite elétrons que são, então, transportados até o $NADP^+$. Os elétrons são repostos por H_2O, que se oxida, liberando O_2.

O transporte de elétrons da água ao $NADP^+$ é efetuado por compostos organizados em três complexos protéicos que atravessam a membrana tilacóide — *PSI*, *PSII* e *citocromo b_6f* — e por dois transportadores móveis: *plastoquinona* (Fig. 15.8), semelhante à ubiquinona (coenzima Q), e *plastocianina*, uma proteína que ocorre na forma livre. Os transportadores solúveis fazem a conexão entre os complexos, exercendo a mesma função da ubiquinona e do citocromo c mitocondriais. Os elétrons percorrem transportadores com potenciais de redução crescentes (ver escala na Fig. 15.7), de modo que as transferências de elétrons são sempre espontâneas. A organização dos transportadores nos cloroplastos segue os mesmos princípios básicos observados na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. A identidade dos transportadores que atuam nos cloroplastos ainda não é totalmente conhecida.

O complexo PSII absorve luz pelo centro de reação, P680, que passa para uma forma excitada, P680*, com potencial de redução muito menor, e que perde elétrons, convertendo-se na forma oxidada, $P680^+$ (Fig. 15.7). $P680^+$ é um forte oxidante capaz de oxidar a água — a regeneração da forma reduzida de P680 é obtida por elétrons provenientes da água. A fotoxidação da água, uma das reações mais endergônicas dos seres vivos, é catalisada por um complexo denominado *OEC* (de *oxygen-evolving complex*). Este complexo contém quatro íons de manganês e um de cálcio, e interage com um resíduo de tirosina, conhecido como Tyr_Z, da mesma subunidade de PSII à qual está associado P680. OEC é o primeiro aceptor dos elétrons da água; eles são transferidos para Tyr_Z e, então, para P680. A atuação de OEC é promover a cisão de duas moléculas de água: quatro elétrons reduzem P680, os prótons são liberados no lúmen do espaço tilacóide e forma-se oxigênio molecular. Por produzir O_2, este tipo de fotossíntese é chamado *fotossíntese oxigênica*. Diversas outras cadeias laterais de aminoácidos de PSII participam indiretamente das transferências de elétrons, estabilizando intermediários instáveis e formando um canal de prótons, que devem migrar de OEC até o lúmen do espaço tilacóide. Os mecanismos catalíticos de PSII, especialmente aqueles relacionados com a oxidação da água, permanecem indeterminados. Os elétrons emitidos por P680 são recebidos por uma cadeia de transportadores de elétrons constituintes de PSII. O primeiro componente desta cadeia (Figs. 15.7 e 15.9) é a feofitina *a* (Feo *a*). As *feofitinas* são moléculas análogas às clorofilas, mas que têm dois prótons substituindo o íon magnésio. Os transportadores seguintes são as *plastoquinonas A* e *B* (PQ_A e PQ_B). A redução de uma molécula de plastoquinona (Fig. 15.8) a plastoquinol requer 2 (H^+ + e^-); como o sítio de PSII onde ocorre essa reação fica em contato com o estroma, é deste compartimento que os prótons são retirados.

A transferência de elétrons das moléculas de plastoquinol, acompanhada de movimentação de prótons, é catalisada pelo citocromo b_6f. Este complexo contém um citocromo do tipo *b* (citocromo b_6), um centro Fe-S e um citocromo do tipo *c*, o citocromo *f* (de *folha*), assemelhando-se ao citocromo bc_1 mitocondrial; como este, promove o acoplamento do transporte de elétrons à translocação de prótons por meio do *ciclo Q* (Seção 11.2). O resultado é a oxidação das moléculas de plastoquinol (QH_2) a plastoquinona (Q): os prótons são bombeados para o interior do espaço tilacóide e os elétrons são doados à *plastocianina* (*Pc*). Da plastocianina, são entregues ao complexo PSI, também sob iluminação.

O complexo PSI absorve luz por meio de P700; este converte-se em uma forma excitada, P700*, com potencial de redução muito baixo, e que, ao emitir elétrons, origina a forma oxidada, $P700^+$ (Fig. 15.7). O déficit de elétrons de P700 é reposto à custa de P680, via plastocianina. A partir de P700, os elétrons percorrem uma cadeia de transporte de elétrons, constituída por uma clorofila do tipo *a* (*Clor a*), uma *filoquinona* (*FQ*) (Fig. 15.8) e três centros ferro-enxofre (*Fe-S*). Os elétrons deixam PSI e reduzem a *ferredoxina* (*Fd*), uma proteína ferro-enxofre presente no estroma; por ação da *ferre-*

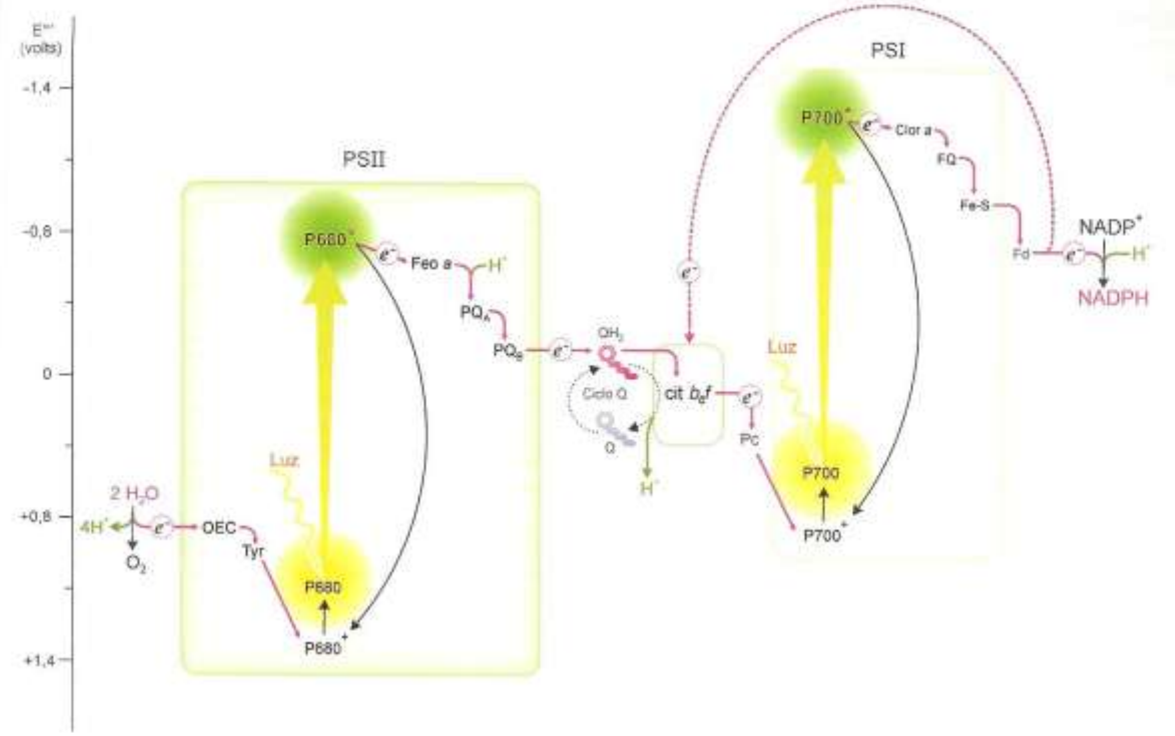
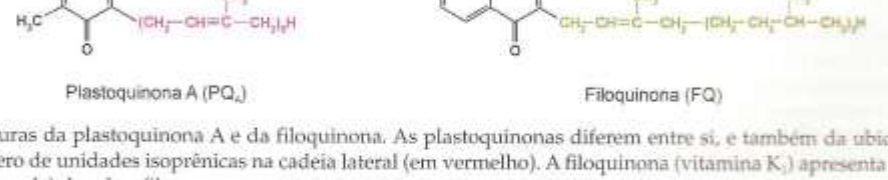


Fig. 15.7 Transferências de elétrons que se processam na fotossíntese de plantas. Quando iluminados, os centros de reação de PSII (P680) e de PSI (P700) passam para formas excitadas (P680* e P700*), com potencial de redução padrão ($E°'$) muito menor, e emitem elétrons, convertendo-se nas formas oxidadas ($P680^+$ e $P700^+$). A reposição de elétrons em PSII é feita por elétrons provenientes da água e, em PSI, por elétrons provenientes de PSII. Na fotofosforilação não-cíclica, os elétrons originários da água reduzem o $NADP^+$. Na fotofosforilação cíclica (seta vermelha tracejada), os elétrons emitidos por ferredoxina são transferidos ao citocromo b_6f, retornando a P700, via plastocianina. OEC: *oxygen-evolving complex*; Tyr: resíduo de tirosina Tyr_Z; Feo *a*: feofitina *a*; PQ_A e PQ_B: plastoquinonas A e B; cit b_6f: citocromo b_6f; plastocianina (Pc); Clor *a*: clorofila *a*; FQ: filoquinona; Fe-S: centros ferro-enxofre; *Fd*: ferredoxina.

doxina-NADP⁺ óxido-redutase (*FNR*) são transferidos para o $NADP^+$, o aceptor final de elétrons, que reage com prótons do estroma, originando NADPH.

Resumindo, a resposta de PSII ao estímulo luminoso é a geração de um potente oxidante, $P680^+$, capaz de clivar a água em elétrons, prótons e O_2; os elétrons, originários da água, são emitidos por P680 e chegam a P700. A resposta de PSI ao mesmo estímulo é gerar um potente redutor, P700*, capaz de doar os elétrons a $NADP^+$, levando à forma-



Plastoquinona A (PQ_A)

Filoquinona (FQ)

Fig. 15.8 Estruturas da plastoquinona A e da filoquinona. As plastoquinonas diferem entre si, e também da ubiquinona, apenas quanto ao número de unidades isoprênicas na cadeia lateral (em vermelho). A filoquinona (vitamina K_1) apresenta a mesma cadeia lateral fitil (em verde) das clorofilas.

ção de NADPH. O transporte de elétrons é acoplado ao deslocamento de prótons, cujo número ainda é incerto, do estroma para o interior do tilacóide. A equação geral de óxido-redução da fase clara da fotossíntese é:

$$2\,H_2O \;+\; 2\,NADP^+ \;+\; nH^+\,(estroma) \xrightarrow{luz} 2\,NADPH \;+\; 2\,H^+ \;+\; O_2 \;+\; nH^+\,(tilacóide)$$

A energia conservada no gradiente de prótons é utilizada para sintetizar ATP, como será analisado a seguir.

O transporte de elétrons gera um gradiente de prótons, utilizado para a síntese de ATP

O transporte de elétrons e a síntese de ATP em cloroplastos apresentam grande semelhança com os mesmos processos ocorrendo em mitocôndrias, e o seu acoplamento é também explicado pela teoria quimiosmótica.

A conexão entre a água e o $NADP^+$ é efetuada por três complexos proteicos que atravessam a membrana tilacóide, ligados por dois transportadores solúveis. Os complexos são orientados de forma assimétrica com relação ao exterior/interior do tilacóide. O transporte de elétrons, como na mitocôndria, acontece em uma membrana impermeável a prótons e que delimita uma vesícula, fatores essenciais para que se estabeleça o gradiente de prótons. O sentido do transporte dos prótons é, de certo modo, oposto ao da mitocôndria: nos cloroplastos, os prótons são bombeados do estroma para o interior da vesícula tilacóide. Quando os elétrons são transferidos de um composto para outro, sempre com diminuição de energia livre, a energia é conservada como um gradiente de prótons através da membrana tilacóide.

As etapas que contribuem para gerar o gradiente de prótons são: a cisão da molécula de água, que libera prótons no lúmen do tilacóide; a redução das plastoquinonas, que retira H^+ do estroma; o bombeamento de prótons do estroma para o interior do tilacóide pelo citocromo b_6f via ciclo Q (quantitativamente, a etapa mais importante) e a redução de $NADP^+$ pela ferredoxina-$NADP^+$ óxido-redutase, que consome H^+ do estroma (Fig. 15.9).

Os prótons devem fluir do interior do tilacóide para o estroma, e isto só é possível pela ATP sintase (Fig. 15.9), que tem estrutura e propriedades semelhantes às da enzima mitocondrial. Todavia, em cloroplastos, tendo em vista a direção do fluxo de prótons, a porção F1 da enzima, que contém o sítio de formação de ATP, fica voltada para o estroma; o

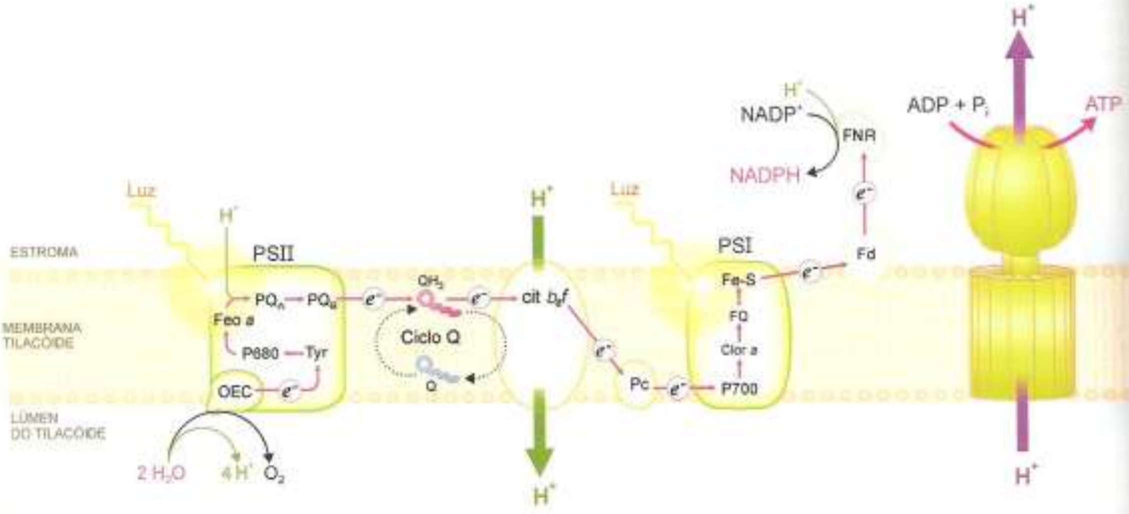


Fig. 15.9 Esquema de um segmento da membrana tilacóide, mostrando a disposição dos componentes que participam do transporte de elétrons desde a água até $NADP^+$, acoplado à fotofosforilação. Os complexos proteicos — PSII, PSI e citocromo b_6f — são interligados por transportadores solúveis: plastocianina e ferredoxina. Ao longo das transferências de elétrons (setas vermelhas), prótons são retirados do estroma, liberados no interior da vesícula tilacóide e bombeados para este compartimento (setas verdes) pelo citocromo b_6f e ciclo Q, a principal etapa responsável pela formação do gradiente de prótons. Os prótons retornam para o estroma através da ATP sintase (seta roxa), que catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e P_i. FNR: ferredoxina-$NADP^+$ óxido-redutase. O significado das demais siglas está indicado na legenda da Fig. 15.7.

processo de síntese de ATP é chamado *fotofosforilação*. Agentes que transferem prótons através de membranas, como o 2,4-dinitrofenol, também desacoplam o transporte de elétrons da síntese de ATP em cloroplastos.

A absorção de um fóton provoca a emissão de um elétron por P680, de modo que 4 fótons são necessários para extrair os 4 elétrons de 2 moléculas de água e produzir uma molécula de O_2; 4 fótons adicionais são absorvidos para a emissão de 4 elétrons por PSI. O resultado da absorção de 8 fótons e do transporte de 4 elétrons é a produção de 2 NADPH (a redução de um $NADP^+$ consome 2 elétrons) e a liberação no lúmen do tilacóide de 12 H^+. A passagem desses prótons pela ATP sintase gera 3 moléculas de ATP. A estequiometria da fase clara da fotossíntese, entretanto, é controversa. Pesquisas recentes indicam a necessidade de 10-11 *quanta* de luz por molécula de O_2 produzida, em vez do valor teórico de 8 *quanta*; mostram também que o rotor da ATP sintase de cloroplastos é formado por 14 polipeptídios, ou seja, sua rotação completa requer a passagem de 14 H^+ para promover a síntese de 3 ATP. Por fim, este rendimento deve estar superestimado, porque não considera o vazamento de prótons através da membrana tilacóide.

Em resumo, no processo de fotoativação dos dois fotossistemas há produção de oxigênio, indispensável para a sobrevivência dos organismos aeróbios, e a energia luminosa é transformada em energia química, armazenada sob a forma de ATP e de NADPH.

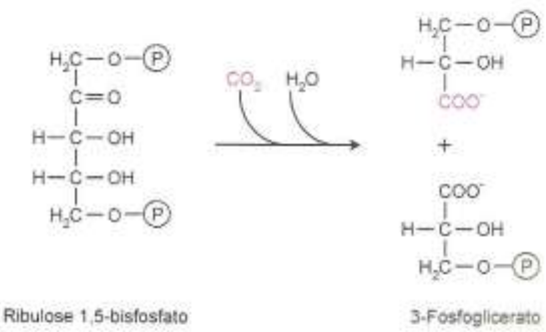
A síntese de ATP pode resultar da fotoexcitação apenas de PSI

Os elétrons da água só são utilizados para a redução de $NADP^+$ quando os dois fotossistemas funcionam acoplados. PSI pode, entretanto, funcionar de modo independente, de tal maneira que os elétrons por ele emitidos a ele retornam, em um processo cíclico (seta vermelha tracejada na Fig. 15.7). Os elétrons de P700*, depois de reduzirem ferredoxina ou $NADP^+$, são transferidos para as plastoquinonas, que são oxidadas pelo citocromo b_6f, com translocação de H^+ para o lúmen do tilacóide; os elétrons, via plastocianina, são devolvidos a PSI, completando o ciclo. Neste tipo de transferência de elétrons, evidentemente, não há produção de NADPH ou liberação de O_2, mas, sim, síntese de ATP, sustentada pelo bombeamento de prótons através do citocromo b_6f. O processo é chamado *fotofosforilação cíclica*, constituindo um tipo de fotossíntese *não-oxigênica*. Apesar de a fotofosforilação cíclica ter sido identificada há 51 anos, o conhecimento a seu respeito só progrediu muito recentemente. Três enzimas diferentes foram sugeridas como catalisadoras da transferência de elétrons de PSI ao citocromo b_6f, elétrons esses que poderiam originar-se de ferredoxina reduzida ou de NADPH. Também não há consenso sobre as condições determinantes do acionamento da fotofosforilação cíclica. Sua função mais provável parece ser a produção de ATP adicional para a fixação de CO_2.

15.4 SÍNTESE DE GLICOSE A PARTIR DE CO_2 (A FASE "ESCURA" DA FOTOSSÍNTESE)

A fixação de CO_2 é feita por carboxilação de ribulose 1,5-bisfosfato

Na fase escura da fotossíntese, ATP e NADPH produzidos na fase clara são utilizados para a redução de CO_2 a glicose. O conjunto de reações enzimáticas responsáveis por esta síntese é chamado *ciclo de Calvin*. O ciclo inicia-se com a carboxilação de ribulose 1,5-bisfosfato (C_5) e clivagem em duas moléculas de 3-fosfoglicerato (2 C_3):

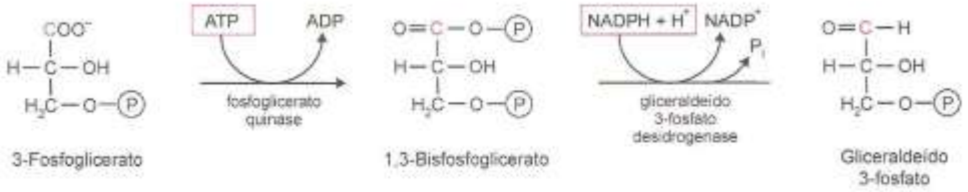


Ribulose 1,5-bisfosfato 3-Fosfoglicerato

A reação é catalisada pela ***ribulose 1,5-bisfosfato** carboxilase/oxigenase*, também chamada *rubisco*, ausente de tecidos animais e, certamente, a enzima mais abundante da biosfera. O nome da enzima indica duas atividades: a de carboxilase, explicitada pela reação acima, e a de oxigenase, cujo significado será descrito na Seção 15.6.

A etapa fundamental de incorporação de CO_2 em uma molécula orgânica está, portanto, cumprida: a partir de ribulose 1,5-bisfosfato, são produzidas duas moléculas de 3-fosfoglicerato, uma das quais contém o átomo de carbono presente no CO_2. Seguem-se as reações do ciclo de Calvin que convertem 3-fosfoglicerato a glicose 6-fosfato, semelhantes às da gliconeogênese, ocorrendo no citossol das células de mamíferos.

O 3-fosfoglicerato é fosforilado à custa de ATP, produzindo 1,3-bisfosfoglicerato e este composto é reduzido a gliceraldeído 3-fosfato. No cloroplasto, estas reações são irreversíveis e a coenzima utilizada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é $NADP^+$; na gliconeogênese, são reversíveis e a coenzima é NAD^+.



O gliceraldeído 3-fosfato é isomerizado a diidroxiacetona fosfato e os dois compostos condensam-se, formando frutose 1,6-bisfosfato; esta é hidrolisada a frutose 6-fosfato, que sofre isomerização a glicose 6-fosfato.

A conclusão do ciclo de Calvin requer a regeneração de ribulose 1,5-bifosfato, efetuada por uma seqüência de reações da qual participam enzimas da gliconeogênese, da via das pentoses fosfato e enzimas características de cloroplastos (sedoeptulose 1,7-bisfosfatase e ribulose 5-fosfato quinase). Iniciando o ciclo com 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato e 6 CO_2, é possível verificar a produção líquida de uma molécula de glicose 6-fosfato e a regeneração das 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato utilizadas (Fig. 15.10). Neste processo há consumo de 18 ATP e 12 NADPH, que corresponde ao dispêndio energético para a síntese de uma molécula de glicose.

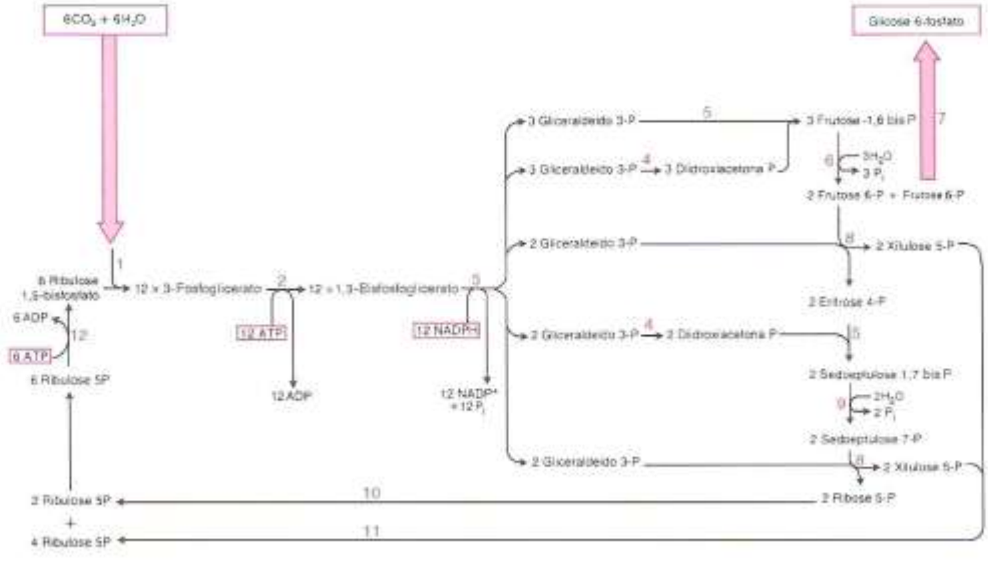


Fig. 15.10 Diagrama da síntese de uma molécula de glicose 6-fosfato a partir de 6 moléculas de CO_2 e 6 moléculas de H_2O pelo ciclo de Calvin. A síntese inicia-se com 6 moléculas de ribulose 1,6-bisfosfato, que são regeneradas por ação das seguintes enzimas: (1) rubisco, (2) fosfoglicerato quinase, (3) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, (4) triose fosfato isomerase, (5) aldolase, (6) frutose 1,6-bisfosfatase, (7) fosfoglicoisomerase, (8) transcetolase, (9) sedoeptulose 1,7-bisfosfatase, (10) ribose fosfato isomerase, (11) fosfopento epimerase e (12) ribulose 5-fosfato quinase.

A equação geral do ciclo de Calvin é:

$$6\,CO_2 + 11\,H_2O + 18\,ATP + 12\,NADPH \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + 18\,ADP + 17\,P_i + 12\,NADP^+$$

Deve-se notar uma vez mais que, como ATP e NADPH são produzidos por utilização da energia luminosa, é esta a fonte energética primária para a síntese de glicose. Quando, à noite, esta fonte de energia não está disponível, os organismos fotossintéticos têm que recorrer aos processos de obtenção de ATP usados pelos seres heterotróficos, isto é, a oxidação de compostos orgânicos pelas vias conhecidas de degradação: glicólise, ciclo de Lynen, ciclo de Krebs etc., e fosforilação oxidativa.

Para a síntese dos polímeros de glicose característicos de vegetais — amido e celulose —, a glicose 6-fosfato sintetizada na fotossíntese deve ser previamente convertida a sacarose, a principal forma de transporte de carbono das folhas para outros tecidos da planta. A síntese de amido está descrita no Capítulo 13.

15.5 REGULAÇÃO DO CICLO DE CALVIN

O ciclo de Calvin, embora seja chamado de *fase escura*, só ocorre em presença de luz. Esta dependência é conseqüência da regulação de enzimas, cuja ativação só é acionada quando há transporte de elétrons induzido por absorção de energia luminosa.

A atividade da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase depende de maneira muito sensível do pH e da concentração de Mg^{2+}, aumentando à medida que estas variáveis aumentam. A rubisco está presente no estroma, e é deste compartimento que os prótons são bombeados para o interior da vesícula tilacóide, durante o transporte de elétrons; concomitantemente, há transferência de íons Mg^{2+} para o estroma. Esta elevação do pH e da concentração de Mg^{2+} ativa a enzima, resultando em eficiente fixação de CO_2. A regulação da rubisco é ainda mais complexa e será retomada na próxima seção.

Um outro mecanismo, que também opera somente na vigência de luz, estimula o ciclo de Calvin. Três enzimas deste ciclo — frutose 1,6-bisfosfatase, sedoeptulose 1,7-bisfosfatase e ribulose 5-fosfato quinase — são funcionais apenas quando têm grupos SH preservados, inativando-se quando estes grupos, oxidados, fazem ligações dissulfeto (R – S – S – R). A redução das pontes dissulfeto é obtida a partir dos elétrons emitidos por PSI sob iluminação e ocorre em etapas: os elétrons são doados à ferredoxina e, em seguida, a uma proteína denominada *tiorredoxina* (Fig. 15.11). O resultado é a redução das pontes dissulfeto de *tiorredoxina* por ferredoxina reduzida, uma reação catalisada pela *ferredoxina-tiorredoxina redutase*; a tiorredoxina pode, então, reduzir as ligações dissulfeto das enzimas, convertendo-as em suas formas ativas. O encadeamento dessas reações de redução, alimentadas por elétrons resultantes da fotoativação de PSI, mantém os grupos SH das enzimas citadas nesta forma reduzida, ativando o ciclo de Calvin, que, portanto, é inapropriadamente chamado de *fase escura*.

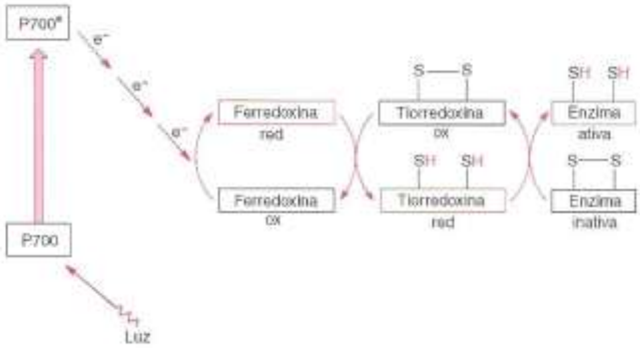


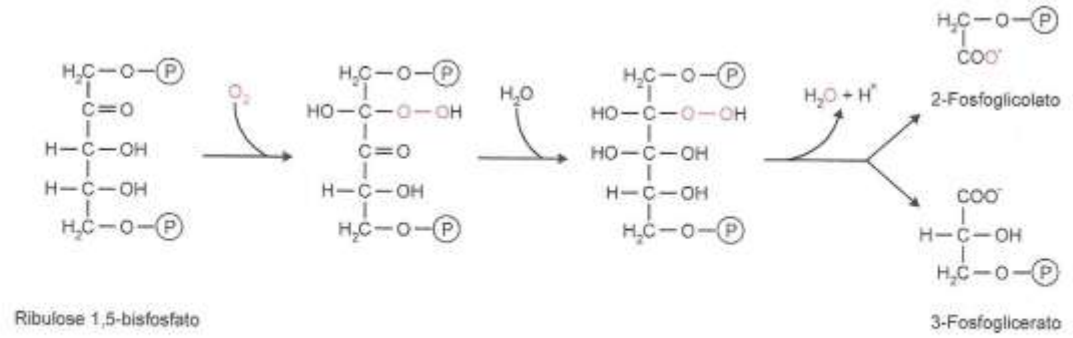
Fig. 15.11 Reações que levam à redução de pontes dissulfeto de enzimas do ciclo de Calvin, à custa de elétrons originados de PSI fotoativado.

15.6 FOTORRESPIRAÇÃO E PLANTAS C_4

A fotorrespiração contrapõe-se à fotossíntese

A ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase atua como carboxilase e oxigenase. O predomínio de uma destas atividades, em um dado momento, dependerá das concentrações relativas de CO_2 e O_2 vigentes, já que estas molécu-

las competem como segundos substratos pela enzima (o primeiro substrato é, naturalmente, a ribulose 1,5-bisfosfato). Quando o O_2 é usado como substrato, em condições de alta concentração de O_2 e baixa de CO_2, as reações que ocorrem são as seguintes:



A atividade de oxigenase da rubisco promove a oxidação da ribulose 1,5-bisfosfato e a cisão em 3-fosfoglicerato e 2-fosfoglicolato. O 2-fosfoglicolato passa por uma complexa série de reações, processadas em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, que envolvem consumo adicional de O_2 e produção de CO_2, razão pela qual a via é denominada *fotorrespiração*. O que é importante ressaltar desta via, além do fato de um carbono ser "perdido" como CO_2, é haver consumo de ATP e NADPH. O resultado da fotorrespiração é, portanto, o gasto inútil de ATP e NADPH produzidos pela fotossíntese.

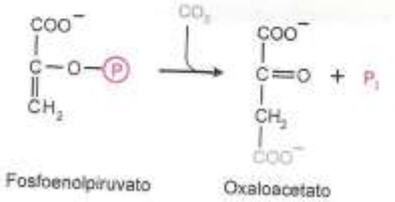
O significado biológico da fotorrespiração é muito pouco claro. Para a maioria dos vegetais, nas concentrações habituais de CO_2 atmosférico, a fotossíntese predomina sobre a fotorrespiração. Entretanto, quando a luminosidade é alta e a temperatura, elevada, a intensa fotossíntese faz diminuir a concentração de CO_2 nos cloroplastos e aumentar a de O_2, que passa a ser utilizado preferencialmente como substrato pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase. Ainda mais, a atividade de oxigenase desta enzima aumenta mais com a temperatura do que a atividade de carboxilase, fazendo com que a intensidade da fotorrespiração aproxime-se da atividade da fotossíntese. Este resultado é um fator limitante para o crescimento de muitas plantas de interesse agrícola. Atualmente estão em curso numerosas tentativas de resolver este problema, por modificação da atividade de oxigenase da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxidase por engenharia genética. Plantas de regiões tropicais desenvolveram mecanismos engenhosos, descritos a seguir, que possibilitam um crescimento adequado mesmo com concentrações baixas de CO_2 em suas folhas.

As plantas tropicais concentram CO_2 formando oxaloacetato

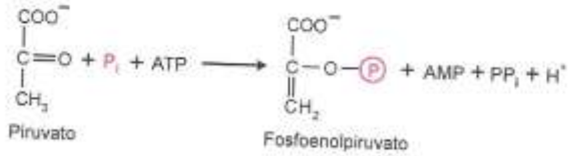
A fixação de CO_2 pela reação catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, que inicia o ciclo de Calvin, ocorre nas chamadas *plantas* C_3, porque o primeiro produto da incorporação é o 3-fosfoglicerato, um composto de *três* carbonos. Algumas plantas tropicais, como cana-de-açúcar e milho, apresentam uma modificação do esquema de fixação: o ciclo de Calvin é precedido pela incorporação de CO_2 em um composto de *quatro* carbonos, o oxaloacetato — são, por isto, chamadas *plantas* C_4. Esta é uma forma de manter altas as concentrações de CO_2 nos cloroplastos destas plantas, evitando a fotorrespiração.

A ocorrência da via de assimilação de CO_2 em compostos de 4 carbonos está associada a um tipo especial de anatomia das folhas. Nas plantas C_4, as *células do mesófilo* localizam-se próximas à superfície da folha, ficando, portanto, em contato com o ar atmosférico; são desprovidas de rubisco e contêm uma carboxilase que origina o composto C_4, que tem afinidade por CO_2 muito maior do que a rubisco. Estas células superficiais envolvem completamente as *células da bainha*, que se situam no interior da folha, circundando o tecido vascular, e que contêm rubisco e todas as enzimas do ciclo de Calvin, além de numerosos cloroplastos. Há, então, uma especialização de funções: as células do mesófilo retêm o CO_2 (como oxaloacetato), que é fornecido para as células da bainha, as únicas capazes de incorporá-lo em glicose.

A enzima responsável pela retenção de CO_2 nas células do mesófilo é a *fosfoenolpiruvato carboxilase* (ausente de células animais), que catalisa a reação:



O oxaloacetato é reduzido a malato por uma malato desidrogenase dependente de NADPH, e o malato é transfe-rido para as células da bainha (Fig. 15.12). Nestas células, o malato é descarboxilado pela enzima málica, produzindo CO_2, NADPH e piruvato. O CO_2 é, então, utilizado na reação catalisada pela rubisco, seguindo-se as demais reações do ciclo de Calvin. O piruvato é transportado para as células do mesófilo, onde regenera fosfoenolpiruvato, por ação da *piruvato-fosfato diquinase*:



O pirofosfato é hidrolisado pela pirofosfatase, resultando em um consumo de 2 ATP por CO_2 transportado para as células da bainha. Desta maneira, a conversão de 6 moléculas de CO_2 em glicose nas plantas C_4 consome 12 ATP a mais do que nas plantas C_3.

Para as plantas tropicais, este processo de fixação contorna uma dificuldade: o fechamento dos estômatos para reduzir a perda de água diminui também o fornecimento de CO_2 para o ciclo de Calvin. O conjunto de adaptações metabólicas e anatômicas das plantas C_4 propicia intensa fixação de CO_2 em glicose nas células da bainha. A glicose é armazenada como amido: os cloroplastos destas células são muito ricos em grãos de amido.

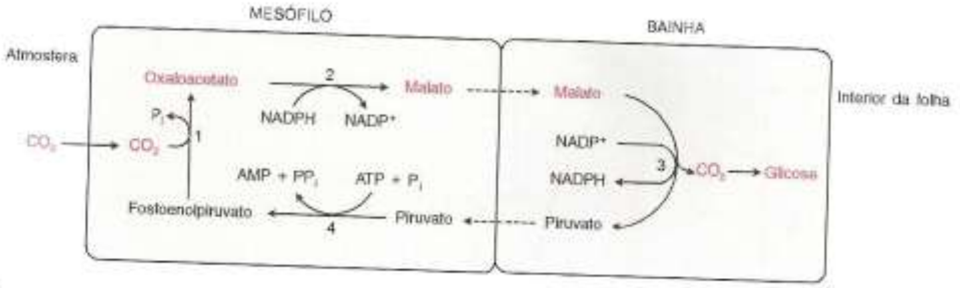


Fig. 15.12 Etapas que precedem a fixação de CO_2 pelas plantas C_4. Nas células do mesófilo, cuja localização superficial permite o pronto acesso ao gás atmosférico, a incorporação de CO_2 em oxaloacetato (C_4) é catalisada pela fosfoenolpiruvato carboxilase (1); por ação da malato desidrogenase dependente de NADPH (2), oxaloacetato forma malato, que é transportado para as células da bainha. Nestas células, o malato é descarboxilado pela enzima málica (3) e o CO_2 é consumido pelo ciclo de Calvin, originando glicose. O piruvato é transferido para as células do mesófilo, onde regenera fosfoenolpiruvato, por ação da piruvato-fosfato diquinase (4).

15.7 FOTOSSÍNTESE EM BACTÉRIAS

A fotossíntese bacteriana produz ATP e pode ou não produzir coenzimas reduzidas e O_2

O mecanismo da fotossíntese nas bactérias varia de acordo com a espécie estudada. As características a serem descri-tas referem-se a alguns grupos importantes destes organismos e pretendem assinalar as discrepâncias e similaridades fundamentais entre o processo bacteriano e o das plantas superiores.

Nas bactérias, o aparelho fotossintetizador pode estar imerso na membrana plasmática ou em estruturas resultantes de invaginações da membrana, geralmente vesículas, chamadas *cromatóforos*.

A fotossíntese bacteriana envolve *sempre* a fotofosforilação, ou seja, a síntese de ATP à custa de energia luminosa: elétrons de alta energia emitidos por pigmentos sob iluminação são transportados por uma cadeia de compostos organizados em uma membrana, em ordem crescente de potencial de redução; parte de energia liberada gera um gradiente de prótons, que é utilizado para sintetizar ATP. Outros aspectos do processo podem diferir bastante, como será exemplificado pela comparação entre três grupos de bactérias: cianobactérias, bactérias verdes e bactérias púrpuras.

A fotossíntese das cianobactérias (*Oscillatoria*, *Anabaena* etc.) assemelha-se à das plantas superiores e algas em múltiplos aspectos. A redução de $NADP^+$ a NADPH é um evento mediado pela luz, ou seja, a fotossíntese produz coenzimas reduzidas — os elétrons para reduzi-las são obtidos por fotólise da água, resultando na produção de O_2. A fotossíntese é do tipo oxigênico, empregando dois fotossistemas, cujos centros de reação são constituídos por clorofila *a*.

Nas bactérias verdes (*Chlorobium*, *Chloroflexus* etc.) e nas bactérias púrpuras (*Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* etc.), a fotossíntese é não-oxigênica, porque não há fotólise da água — os doadores de elétrons utilizados são H_2S, H_2 ou compostos orgânicos presentes no meio. Há somente um fotossistema, e o pigmento fotorreceptor é uma bacterioclorofila. As bacterioclorofilas exibem diferenças estruturais discretas em relação às clorofilas (Fig. 15.4), mas que resultam em deslocamento da absorção máxima para comprimentos de onda mais longos (até 1.040 nm). A fotossíntese não-oxigênica pode (caso das bactérias verdes) ou não (bactérias púrpuras) envolver a redução de coenzimas.

A fotossíntese não-oxigênica é mais bem conhecida nas bactérias púrpuras. O fotossistema destas bactérias assemelha-se estruturalmente ao fotossistema II das plantas, mas o transporte de elétrons é cíclico, como acontece com PSI. O fotossistema é um complexo proteico que atravessa a membrana plasmática, ao qual se associam quatro moléculas de bacterioclorofila, duas moléculas de bacteriofeofitina (Bfeo), um íon de ferro, cuja função ainda não está esclarecida, e duas quinonas (Q_A e Q_B). Em algumas espécies, o fotossistema contém também um citocromo do tipo *c* com quatro grupos heme. Duas das quatro moléculas de bacterioclorofila formam o par especial, responsável pela dissipação da energia luminosa absorvida por emissão de elétrons. Em alguns casos, a absorção máxima dá-se a 870 nm e, por isto, o centro de reação é referido como P870. Os elétrons são transferidos para as feofitinas, passando destas para Q_A e, depois, para Q_B (Fig. 15.13). Segue-se a oxidação das quinonas pelo citocromo bc_1 (análogo ao citocromo b_6f de cloroplastos e ao Complexo III mitocondrial), acoplada ao bombeamento de prótons do citoplasma para o espaço periplasmático.

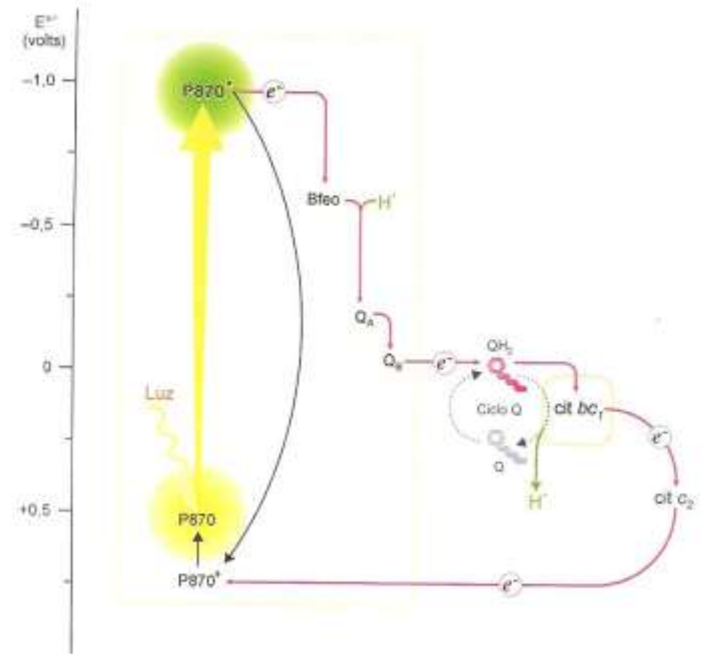


Fig. 15.13 Fluxo cíclico de elétrons durante a fotossíntese não-oxigênica de bactérias púrpuras.

O complexo bc_1 entrega elétrons ao citocromo c_2, uma proteína periférica semelhante ao citocromo *c* mitocondrial. Do citocromo c_2, os elétrons retornam ao P870, que pode recomeçar o transporte cíclico de elétrons. Forma-se um gradiente de prótons através da membrana plasmática e, na volta desses prótons do espaço periplasmático para o citossol pela ATP sintase, produz-se ATP. O processo é uma fotofosforilação cíclica e, como na fotofosforilação cíclica dos vegetais, não há fotólise da água, nem produção de coenzimas reduzidas.

As bactérias verdes usam a energia da luz para transferir elétrons para $NADP^+$. Estas bactérias têm um único fotossistema que absorve luz, passa para uma forma excitada e emite elétrons. Os elétrons são transferidos para ferredoxina e, em seguida, por ação de uma redutase, para $NADP^+$, que é convertido a NADPH.

Na fotossíntese das bactérias verdes e púrpuras, os elétrons são repostos por redutores do meio (H_2S, H_2, NO_2^-, álcoois, ácidos). A dependência da disponibilidade de tais compostos limita a sobrevivência destas bactérias a nichos ecológicos restritos.

A fixação de CO_2 nas bactérias fotossintéticas pode ser obtida pelo ciclo de Calvin ou por vias metabólicas específicas, que não serão analisadas neste texto.

BIBLIOGRAFIA

Cruz JA et al: Storage of light-driven transthylakoid proton motive force as an electric field (Deltapsi) under steady-state conditions in intact cells of Chlamydomonas reinhardtii. *Photosynth Res* **85**(2):221-233, 2005.

Dimroth P et al: Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J Exp Biol* **203**(Pt 1):51-59, 2000.

Edwards GE et al: Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C_4 plants. *Journal of Experimental Botany* **52**(356):577-590, 2001.

Ferreira KN et al: Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**(5665):1831-1838, 2004.

Ishijima S et al: Effects of alkalinization and ATPase inhibition on stromal free Mg^{2+} concentration in spinach chloroplasts. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**(11):2411-2414, 2004.

Johnson GN: Cyclic electron transport in C_3 plants: fact or artifact? *Journal of Experimental Botany* **56**(411):407-416, 2005.

Joliot P, Joliot A: Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(15):10209-10214, 2002.

16

Metabolismo de Lipídios

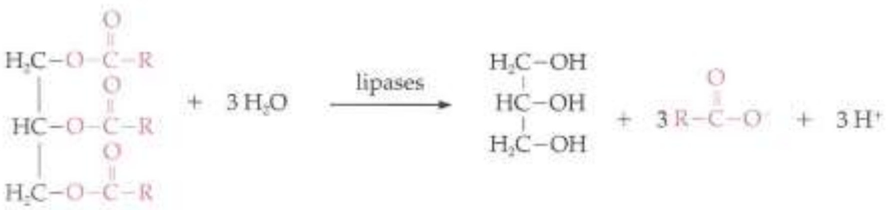
Os lipídios da dieta humana, absorvidos no intestino, e aqueles sintetizados endogenamente são distribuídos aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas, para utilização ou armazenamento. Os triacilgliceróis são os lipídios dietéticos mais abundantes e constituem a forma de armazenamento de todo o excesso de nutrientes, quer este excesso seja ingerido sob a forma de carboidratos, proteínas ou dos próprios lipídios. Representam a maior reserva energética do organismo, perfazendo, em média, 20% do peso corpóreo, o que equivale a uma massa 100 vezes maior do que a do glicogênio hepático. Como são compostos mais reduzidos que os carboidratos, sua oxidação apresenta rendimento maior: 9 kcal/g, enquanto a oxidação de carboidratos produz 4 kcal/g. Os triacilgliceróis são armazenados nas células adiposas, sob forma anidra, e podem ocupar a maior parte do volume celular.

A vantagem de armazenar lipídios, em vez de carboidratos, fica evidente quando se comparam as massas dos dois compostos que seriam capazes de fornecer a mesma quantidade de energia. Em um homem adulto, pesando 70 kg, a reserva de triacilgliceróis compreende cerca de 15 kg. Como a oxidação de carboidratos produz, aproximadamente, 2,5 vezes menos energia que a oxidação de lipídios, a reserva de carboidratos equivalente a 15 kg de triacilgliceróis deveria ser de 37,5 kg. Adicionalmente, os carboidratos fazem pontes de hidrogênio com a água: 1 g de glicogênio adsorve 3 g de água; assim, 37,5 kg de glicogênio adsorveriam 112,5 kg de água. Portanto, uma reserva constituída por glicogênio, com a mesma quantidade de energia contida em 15 kg de triacilgliceróis, corresponderia a cerca de 150 kg. Ou seja, o indivíduo, em vez de 70 kg, pesaria 220 kg!

A utilização do depósito de triacilgliceróis pelo organismo e a sua reconstrução processam-se por vias metabólicas diferentes, localizadas em compartimentos celulares diferentes e, obviamente, submetidas a regulações antagônicas (Capítulo 20).

16.1 DEGRADAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS

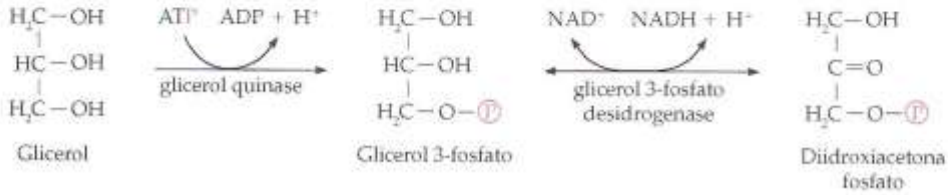
A mobilização do depósito de triacilgliceróis é iniciada por ação da *lipase hormônio-sensível* dos adipócitos, assim chamada por ser sujeita a regulação hormonal (Seção 20.7). A enzima catalisa a remoção de um ácido graxo do triacilglicerol; outras lipases completam o processo de hidrólise dos triacilgliceróis a glicerol e ácidos graxos:



Triacilglicerol — Glicerol — Ácidos graxos

Os produtos da hidrólise de triacilgliceróis são oxidados por processos distintos.

O *glicerol* não pode ser reaproveitado pelos adipócitos, que não têm *glicerol quinase*, sendo então liberado na circulação. No fígado e outros tecidos, por ação desta quinase, é convertido a *glicerol 3-fosfato*, que pode ser transformado em diidroxiacetona fosfato, um intermediário da glicólise ou da gliconeogênese.



Os *ácidos graxos* liberados dos adipócitos são transportados pelo sangue ligados à albumina e utilizados pelos tecidos, incluindo fígado e músculos, como fonte de energia; o tecido nervoso e as hemácias são exceções, porque obtêm energia exclusivamente a partir da degradação de glicose.

Os triacilgliceróis da dieta, transportados pelos quilomícrons, são hidrolisados pela *lipase lipoproteica*, uma enzima extracelular, que fica ancorada no endotélio dos capilares dos tecidos extra-hepáticos. Os produtos finais da hidrólise, como no caso da lipase dos adipócitos, são glicerol e ácidos graxos, que se tornam, assim, disponíveis para as células. Os remanescentes dos quilomícrons, empobrecidos de triacilgliceróis e proporcionalmente enriquecidos de colesterol, são retirados da circulação pelo fígado, por endocitose. O metabolismo do colesterol será analisado na Seção 16.8.

Os ácidos graxos, mobilizados do tecido adiposo ou provenientes da dieta, são oxidados por uma via que se processa no interior das mitocôndrias.

16.2 DEGRADAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS: ATIVAÇÃO, TRANSPORTE E OXIDAÇÃO

Para sua oxidação, os ácidos graxos são ativados e transportados para a matriz mitocondrial

Para ser oxidado, o ácido graxo, como acontece com a glicose, é primeiramente convertido em uma forma ativada, neste caso, uma *acil-CoA*. Esta etapa prévia é catalisada pela *acil-CoA sintetase*, associada à membrana externa da mitocôndria:

$$\underset{\text{Ácido graxo}}{R-CH_2-CH_2-COO^-} + ATP + H-SCoA \longrightarrow \underset{\text{Acil-CoA}}{R-CH_2-CH_2-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-SCoA} + AMP + PP_i$$

Nesta reação, forma-se uma ligação tioéster entre o grupo carboxila do ácido graxo e o grupo SH da coenzima A, produzindo uma acil-CoA. As acil-CoA, como a acetil-CoA, são compostos ricos em energia. Sua ligação tioéster é formada à custa da energia derivada de uma ligação anidrido fosfórico por clivagem do ATP em adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato ($HP_2O_7^{3-}$ ou PP_i). O pirofosfato é hidrolisado a dois fosfatos inorgânicos (2 HPO_4^{2-} ou 2 P_i) numa reação irreversível, o que torna o processo de ativação do ácido graxo a acil-CoA também irreversível.

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a acil-CoA, mas os grupos acila podem ser introduzidos na mitocôndria, quando ligados à *carnitina*. Este composto, sintetizado a partir de aminoácidos, é amplamente distribuído nos tecidos animais e vegetais, sendo especialmente abundante em músculos. A ligação reversível do grupo acila à carnitina é catalisada pela *carnitina-acil transferase* (Fig. 16.1 a). Existem duas isoformas da enzima, denominadas *I* e *II*, que se localizam nas faces externa e interna da membrana interna da mitocôndria, respectivamente. O sistema utilizado para o transporte de grupos acila consta de quatro etapas (Fig. 16.1 b): (1) na face externa da membrana, a carnitina-acil transferase I transfere o grupo acila da coenzima A para a carnitina; (2) a acil-carnitina resultante é transportada através da membrana interna por uma translocase específica; (3) na face interna, a carnitina-acil transferase II doa o grupo acila da acil-carnitina para uma coenzima A da matriz mitocondrial, liberando carnitina; (4) a carnitina retorna ao citossol pela mesma translocase. Deste modo, o grupo acila dos ácidos graxos atinge o interior da mitocôndria, onde ocorre a sua oxidação.

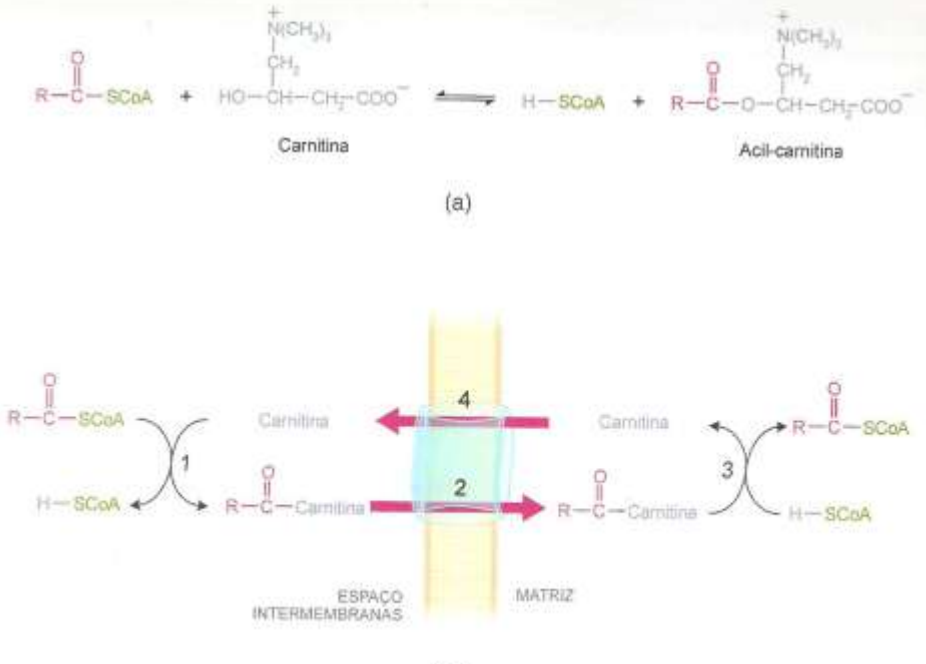


Fig. 16.1 Transporte de grupos acila para a mitocôndria. a) Reação catalisada pela carnitina-acil transferase. b) Sistema de transporte de grupos acila — os números referem-se às etapas descritas no texto.

Na β-oxidação, a acil-CoA é oxidada a acetil-CoA, produzindo $FADH_2$ e NADH

A acil-CoA presente na matriz mitocondrial é oxidada por uma via denominada *β-oxidação*, porque promove a oxidação do carbono β do ácido graxo, ou *ciclo de Lynen* (Fig. 16.2). Esta via consta de uma série cíclica de quatro reações, ao final das quais a acil-CoA é encurtada de dois carbonos, que são liberados sob a forma de acetil-CoA, com produção de $FADH_2$ e NADH. As quatro reações e as enzimas que as catalisam são:

1. Oxidação da acil-CoA a uma enoil-CoA (acil-CoA β-insaturada) de configuração *trans*, à custa da conversão de FAD a $FADH_2$, a única reação irreversível da via — *acil-CoA desidrogenase*.
2. Hidratação da dupla ligação, produzindo o isômero L de uma β-hidroxiacil-CoA — *enoil-CoA hidratase*.
3. Oxidação do grupo hidroxila a carbonila, resultando uma β-cetoacil-CoA e NADH — *β-hidroxiacil-CoA desidrogenase*.
4. Cisão da β-cetoacil-CoA por reação com uma molécula de CoA, com formação de acetil-CoA e uma acil-CoA com dois carbonos a menos; esta acil-CoA refaz o ciclo várias vezes, até ser totalmente convertida a acetil-CoA — *tiolase*.

A atividade da β-oxidação em diferentes condições fisiológicas será discutida no Capítulo 20.

A oxidação de ácidos graxos ocorre também nos peroxissomos

Os *peroxissomos* são organelas citoplasmáticas, envoltas por uma membrana única, presentes em praticamente todas as células eucarióticas. Estas organelas encarregam-se de diversos processos metabólicos, que incluem, invariavelmente, a degradação de ácidos graxos; outras funções dos peroxissomos variam de acordo com o organismo ou o tipo de célula considerado. A via de *β-oxidação peroxissômica* guarda semelhanças e diferenças com a β-oxidação mitocondrial, sendo catalisada, naturalmente, por enzimas específicas.

Nos mamíferos, a oxidação de ácidos graxos ocorre nas mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático. As mitocôndrias são responsáveis pela β-oxidação de ácidos graxos de cadeia linear curta, média e longa. A β-oxidação

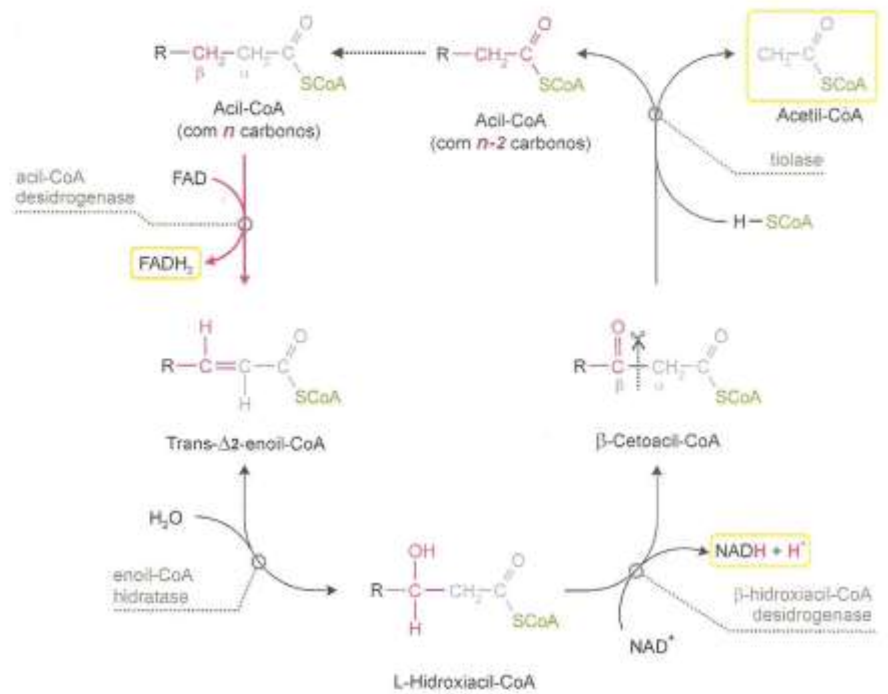
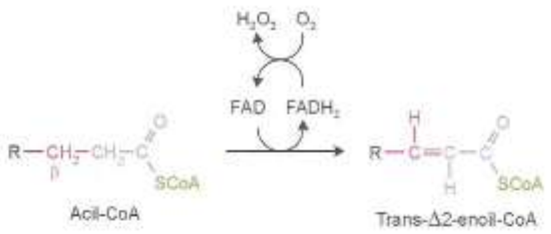


Fig. 16.2 Via da β-oxidação ou ciclo de Lynen: a acil-CoA formada no final de cada volta tem dois carbonos a menos e reinicia o ciclo (seta pontilhada). A única reação irreversível é aquela catalisada pela acil-CoA desidrogenase (setas vermelhas). Os produtos finais da via — acetil-CoA, $FADH_2$ e NADH — estão incluídos em retângulos amarelos.

peroxissômica promove o encurtamento de ácidos graxos de cadeia linear muito longa (com mais de 20 carbonos), ácidos graxos ramificados, ácidos graxos dicarboxílicos e da cadeia lateral de intermediários da síntese de ácidos biliares. No retículo endoplasmático, encontra-se uma via de importância menor, a *ω-oxidação*; nesta via, catalisada pelo sistema do citocromo P_{450}, o carbono ω (terminal metila dos ácidos graxos, Seção 6.2.1) é oxidado, originando ácidos graxos dicarboxílicos, que são substratos da β-oxidação peroxissômica.

Os ácidos graxos de cadeia muito longa são transportados por uma permease, sem auxílio da carnitina, para o interior dos peroxissomos, onde são convertidos nas respectivas acil-CoA. A primeira etapa de oxidação, como aquela mitocondrial, é a transformação das acil-CoA muito longas nas respectivas trans-Δ2-enoil-CoA, com redução de FAD, catalisada por uma flavoproteína. No caso da flavoproteína mitocondrial, a acil-CoA desidrogenase, os elétrons do $FADH_2$ são entregues à cadeia de transporte de elétrons, gerando ATP; na reação promovida pela enzima peroxissômica, a *acil-CoA oxidase*, os elétrons do $FADH_2$ são transferidos diretamente ao oxigênio, que é reduzido a água oxigenada:



A água oxigenada é decomposta em H_2O e $½O_2$ por ação da catalase presente nos peroxissomos.

A trans-Δ2-enoil-CoA é oxidada pelas mesmas etapas da β-oxidação mitocondrial, catalisadas, todavia, por uma enzima bifuncional, que exibe as atividades de *enoil-CoA hidratase* e *β-hidroxiacil-CoA desidrogenase*; adicionalmente, a *tiolase* de peroxissomos só aceita como substrato acil-CoA com número de carbonos maior do que oito. As moléculas resultantes da β-oxidação peroxissômica podem ser transportadas para as mitocôndrias, onde sua degradação total pode ser levada a cabo.

Patologias graves são causadas por defeitos genéticos relacionados com a oxidação peroxissômica de ácidos graxos. A *adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X*, por exemplo, resulta da deficiência de uma única proteína, a permease que transfere os ácidos graxos de cadeia muito longa através da membrana dos peroxissomos. A moléstia afeta o sistema nervoso e as glândulas adrenais: há uma destruição progressiva da bainha de mielina (de cor branca) das fibras nervosas componentes da substância branca desses órgãos, que origina a denominação adreno*leuco*distrofia (*leuko*, em grego, significa branco). Manifesta-se geralmente na infância e tem conseqüências fatais. Um outro exemplo, a *síndrome de Zellweger* é devida a distúrbios na biogênese dos peroxissomos, com perda de múltiplas funções; caracteriza-se por disfunções severas do sistema nervoso, fígado e rins, principalmente, que levam à morte no primeiro ano de vida. As alterações metabólicas comuns às doenças hereditárias peroxissômicas são os níveis aumentados de ácidos graxos muito longos, de precursores dos ácidos biliares e de ácidos graxos ramificados, no plasma e em diversos tecidos. O mecanismo que relaciona estas alterações à instalação das moléstias não é conhecido até o presente.

Nos vegetais, a β-oxidação de ácidos graxos é feita nos peroxissomos e glioxissomos (um tipo especializado de peroxissomos, característico de sementes oleaginosas). Os peroxissomos de tecidos foliares de certos tipos de plantas participam, ainda, da fotorrespiração (Seção 15.6). A acetil-CoA produzida nos glioxissomos pode ser convertida em glicose graças à presença, nestas organelas, das enzimas do *ciclo do glioxilato* (Seção 10.3). Estas enzimas estão ausentes de células animais, que, por isto, são incapazes de utilizar acetil-CoA como composto gliconeogênico.

A oxidação do ácido palmítico produz 129 ATP

A oxidação completa de um ácido graxo exige a cooperação entre o ciclo de Lynen, que converte o ácido graxo a acetil-CoA, e o ciclo de Krebs, que oxida o grupo acetila a CO_2.

Em cada volta do ciclo de Lynen, há produção de 1 $FADH_2$, 1 NADH, 1 acetil-CoA e 1 acil-CoA com dois átomos de carbono a menos que o ácido graxo original. Sempre que o número de átomos de carbono do ácido graxo for par, a *última* volta do ciclo de oxidação inicia-se com uma acil-CoA de quatro carbonos, a butiril-CoA, e, neste caso, são produzidas 2 acetil-CoA (além de $FADH_2$ e NADH).

O número de voltas percorridas por um ácido graxo até sua conversão total a acetil-CoA dependerá, naturalmente, do seu número de átomos de carbono. Assim sendo, para a oxidação completa de uma molécula de ácido palmítico, que tem 16 átomos de carbono, são necessárias *sete* voltas no ciclo, já que na última volta formam-se *duas* moléculas de acetil-CoA, com a produção de 8 acetil-CoA. A oxidação de cada acetil-CoA no ciclo de Krebs origina 3 NADH, 1 $FADH_2$ e 1 GTP. Pela fosforilação oxidativa, NADH e $FADH_2$ formam, respectivamente, 3 e 2 ATP. A produção de ATP resultante da oxidação completa do ácido palmítico está discriminada na Tabela 16.1. Do total de ATP formado (131) deve ser descontado o gasto inicial na reação de ativação do ácido graxo, onde há conversão de ATP a AMP + $2P_i$ e, portanto, consumo de duas ligações ricas em energia, o que equivale a um gasto de 2 ATP (conversão de 2 ATP a 2 ADP). O rendimento final da oxidação do ácido palmítico é, então, 129 ATP.

Tabela 16.1 Produção de ATP na oxidação de ácido palmítico

Produtos da β-oxidação	Produtos da oxidação de 8 acetil-CoA no ciclo de Krebs	Total (β-oxidação + Krebs)	ATP formados
8 acetil-CoA			
7 NADH	24 NADH	31 NADH	93
7 $FADH_2$	8 $FADH_2$	15 $FADH_2$	30
	8 GTP	8 GTP	8
Total[1]			131

[1] O rendimento energético da oxidação do ácido palmítico é igual a 129 ATP, porque, dos 131 produzidos, devem ser descontados 2 ATP consumidos na ativação do ácido graxo.

A β-oxidação dos ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono produz propionil-CoA, que é convertida a succinil-CoA

Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono constituem uma fração minoritária dos ácidos graxos da dieta e são também oxidados pela via da β-oxidação. Neste caso, entretanto, a última volta do ciclo de Lynen inicia-se com uma acil-CoA de cinco carbonos e produz uma molécula de acetil-CoA e uma de propionil-CoA, em vez de duas de acetil-CoA. A propionil-CoA origina-se também da degradação de alguns aminoácidos.

Para sua oxidação, a *propionil-CoA* é convertida a *succinil-CoA*, um intermediário do ciclo de Krebs. A conversão (Fig. 16.3) inicia-se com carboxilação a D-metilmalonil-CoA, em uma reação que requer *biotina*, a coenzima que transfere CO_2, como acontece em outras carboxilações: conversão de piruvato a oxaloacetato e de acetil-CoA a malonil-CoA. Em seguida, D-metilmalonil-CoA forma succinil-CoA em duas etapas: transformação do isômero D em L e isomerização deste último composto, utilizando como coenzima a *5'-desoxiadenosil-cobalamina*, um derivado da cobalamina (vitamina B_{12}).

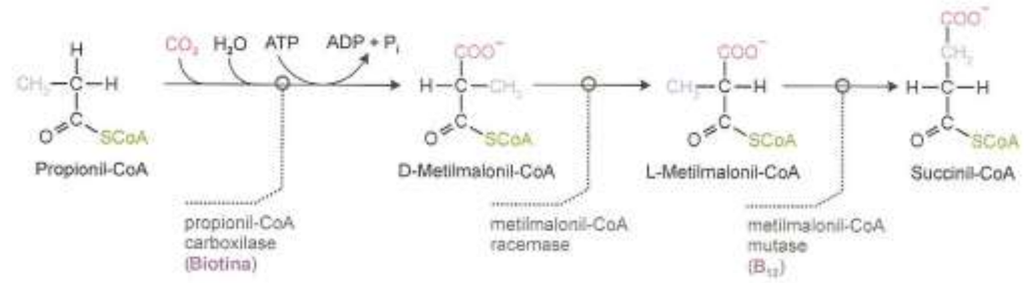


Fig. 16.3 Conversão de propionil-CoA, proveniente da oxidação de ácidos graxos de número ímpar de carbonos, a succinil-CoA.

A oxidação de ácidos graxos insaturados também requer enzimas adicionais

Os ácidos graxos insaturados são muito comuns em tecidos animais e vegetais, e suas duplas ligações apresentam quase sempre a configuração *cis* (Capítulo 6).

Após a remoção de algumas unidades de dois carbonos (como acetil-CoA) pelo ciclo de Lynen, o ácido graxo insaturado pode originar dois tipos de enoil-CoA, conforme a posição original da dupla ligação em sua molécula (Fig. 16.4): se a dupla ligação for de número ímpar, como a Δ9 do ácido oleico, forma-se uma cis-Δ3-enoil-CoA; se for de número par, como a Δ12 do ácido linoleico, resulta uma cis-Δ4-enoil-CoA[1]. Para a oxidação dessas acil-CoA insaturadas, são necessárias, além das enzimas da β-oxidação, outras enzimas que as convertam em trans-Δ2-enoil-CoA, o intermediário insaturado da β-oxidação, substrato da enoil-CoA hidratase.

No caso em que é obtida cis-Δ3-enoil-CoA (Fig. 16.4 a), uma *enoil-CoA isomerase* possibilita a sua transformação em trans-Δ2-enoil-CoA.

O segundo tipo de enoil-CoA que pode ser produzida, cis-Δ4-enoil-CoA (Fig. 16.4 b), é reconhecida pela acil-CoA desidrogenase do ciclo de Lynen, que a converte, porém, em uma *trans-Δ2-cis-Δ4-dienoil-CoA*, que não é aceita pela enoil-CoA hidratase. Para o prosseguimento de sua oxidação, é necessária a participação de uma *dienoil-CoA redutase*, que reduz a ligação cis-Δ4 à custa de NADPH, originando *trans-Δ3-enoil-CoA*. Na seqüência, uma *trans-Δ3 → trans-Δ2 isomerase* transforma a dupla ligação trans-Δ3 em trans-Δ2, chegando-se, portanto, ao intermediário insaturado da β-oxidação.

Ácidos graxos ramificados ou hidroxilados são oxidados inicialmente por α-oxidação

Ácidos graxos contendo ramificações ou hidroxilações são pouco freqüentes nos animais superiores. Nestes organismos, os ácidos graxos ramificados ocorrem apenas como componentes da cera produzida pelas glândulas sebáceas,

[1]Os sistemas de representação de duplas ligações de ácidos graxos insaturados estão descritos na Seção 6.2.1.

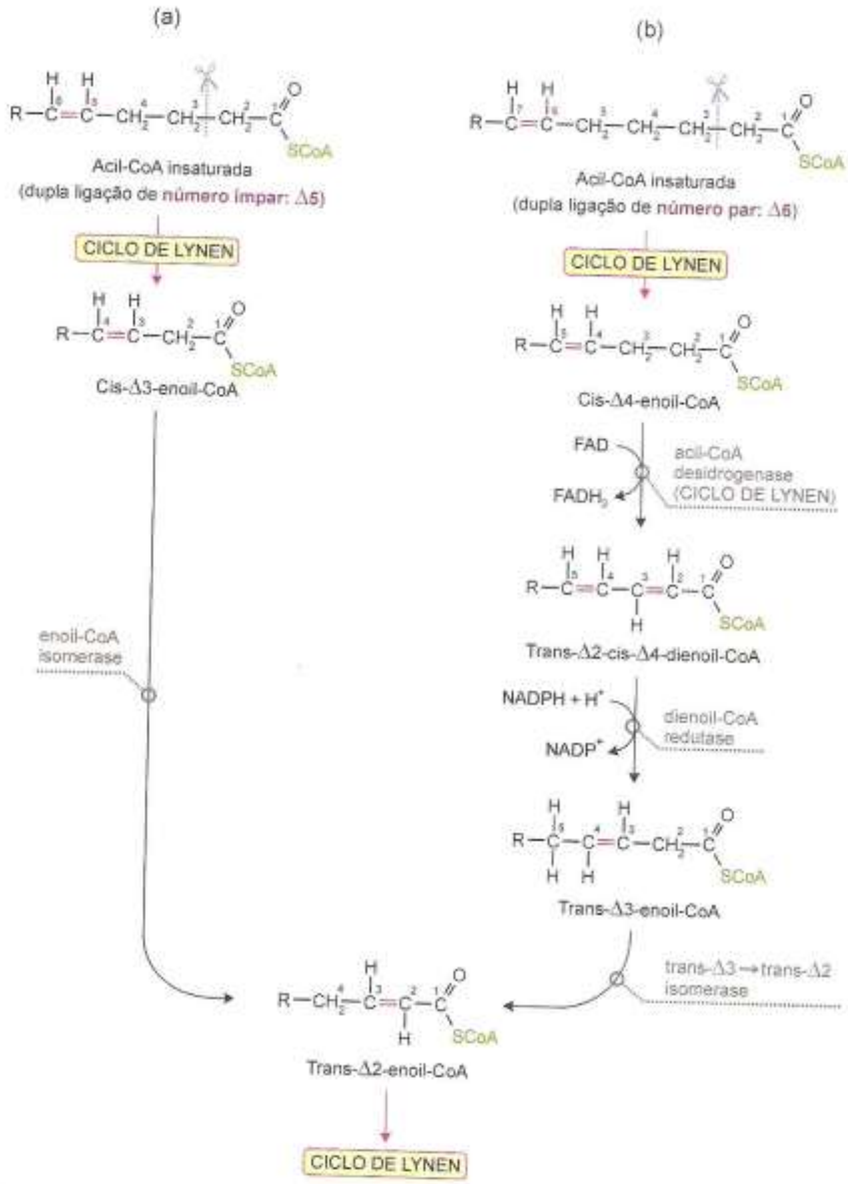


Fig. 16.4 Reações adicionais às do ciclo de Lynen para a oxidação de ácidos graxos insaturados. a) Quando o ácido graxo tem uma dupla ligação de número ímpar — Δ5 no exemplo considerado — após algumas voltas do ciclo de Lynen, resulta uma cis-Δ3-enoil-CoA; b) quando tem uma dupla ligação de número par — Δ6 no exemplo — é produzida uma cis-Δ4-enoil-CoA.

e os hidroxilados (uma hidroxila no carbono α), como componentes de esfingolipídios do sistema nervoso. Um ácido graxo ramificado constitui uma exceção: é o *ácido fitânico*, derivado do *fitol* (Fig. 16.5 a), um álcool com 20 carbonos que constitui a cadeia lateral isoprenóide da clorofila. Os animais ruminantes, por pastarem, ingerem grandes quantidades de clorofila, da qual o fitol é eficientemente removido pelas bactérias do trato gastrointestinal; uma vez na forma livre, o fitol é absorvido e oxidado a ácido fitânico, que é incorporado aos lipídios do tecido adiposo e do leite. Como conseqüência, as fontes dietéticas de ácido fitânico para os seres humanos são as gorduras, o leite e os laticínios provenientes de ruminantes.

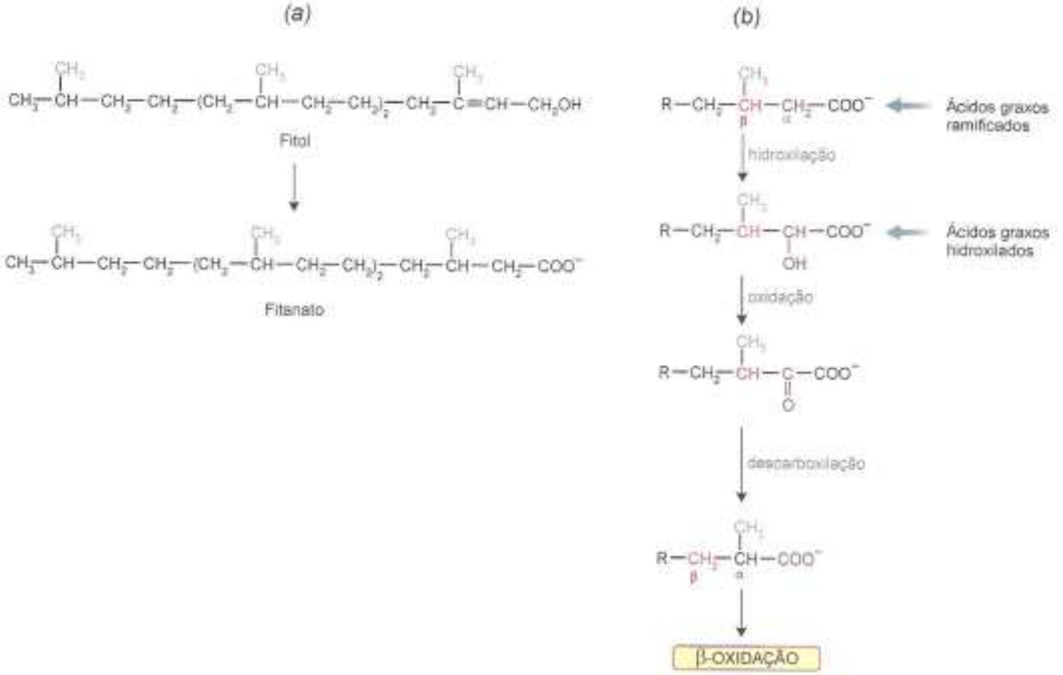


Fig. 16.5 a) Estrutura do fitol e do fitanato (ácido fitânico). b) Etapas principais da α-oxidação peroxissômica de ácidos graxos ramificados e hidroxilados: por hidroxilação do carbono α, os ácidos graxos ramificados originam ácidos graxos hidroxilados, que, após oxidação e descarboxilação, são convertidos em substratos da β-oxidação.

O ácido fitânico (*fitanato*, no pH fisiológico) possui um grupo metila no carbono β (e em outros carbonos de número ímpar), que não é reconhecido pela acil-CoA desidrogenase, que catalisa a primeira reação da β-oxidação. Esta situação é contornada pela *α-oxidação* (Fig. 16.5 b), que ocorre nos peroxissomos e se inicia com a hidroxilação do carbono α. Neste ponto, a degradação dos ácidos graxos metilados confunde-se com aquela dos ácidos graxos hidroxilados. Segue-se uma oxidação e uma descarboxilação, resultando um composto que tem o grupo metila agora no carbono α e apresenta o carbono β não-substituído, podendo ser ativado e oxidado pela β-oxidação peroxissômica.

A deficiência hereditária da enzima que catalisa a hidroxilação do carbono α resulta em acúmulo de fitanato no sangue e nos tecidos, e ocorrência de lesões neurológicas múltiplas na fase adulta — trata-se da *moléstia de Refsum*. Defeitos genéticos da biogênese de peroxissomos, como a síndrome de Zellweger, também determinam níveis anormais de fitanato, embora, nestes casos, a α-oxidação defectiva seja apenas uma dentre outras anomalias metabólicas.

16.3 CORPOS CETÔNICOS

No fígado, a acetil-CoA pode ser convertida a corpos cetônicos, oxidados nos tecidos extra-hepáticos

Uma pequena quantidade de acetil-CoA é normalmente transformada em *acetoacetato* e *β-hidroxibutirato* nos hepatócitos de mamíferos. O acetoacetato sofre descarboxilação espontânea, originando *acetona*. Os três compostos são chamados, em conjunto, de *corpos cetônicos*[2], e sua síntese, de *cetogênese*. Esta ocorre na matriz mitocondrial, pela condensação de três moléculas de acetil-CoA em duas etapas (Fig. 16.6). Na primeira, catalisada pela tiolase, duas moléculas de acetil-CoA originam acetoacetil-CoA; esta reação, embora transcorrendo no sentido oposto, constitui a última reação da última volta do ciclo de Lynen. A reação de acetoacetil-CoA com uma terceira molécula de acetil-CoA forma

[2]A denominação "cetônicos" é inadequada porque apenas um dos corpos cetônicos é uma cetona e os outros dois são ácidos, mas comumente utilizada.

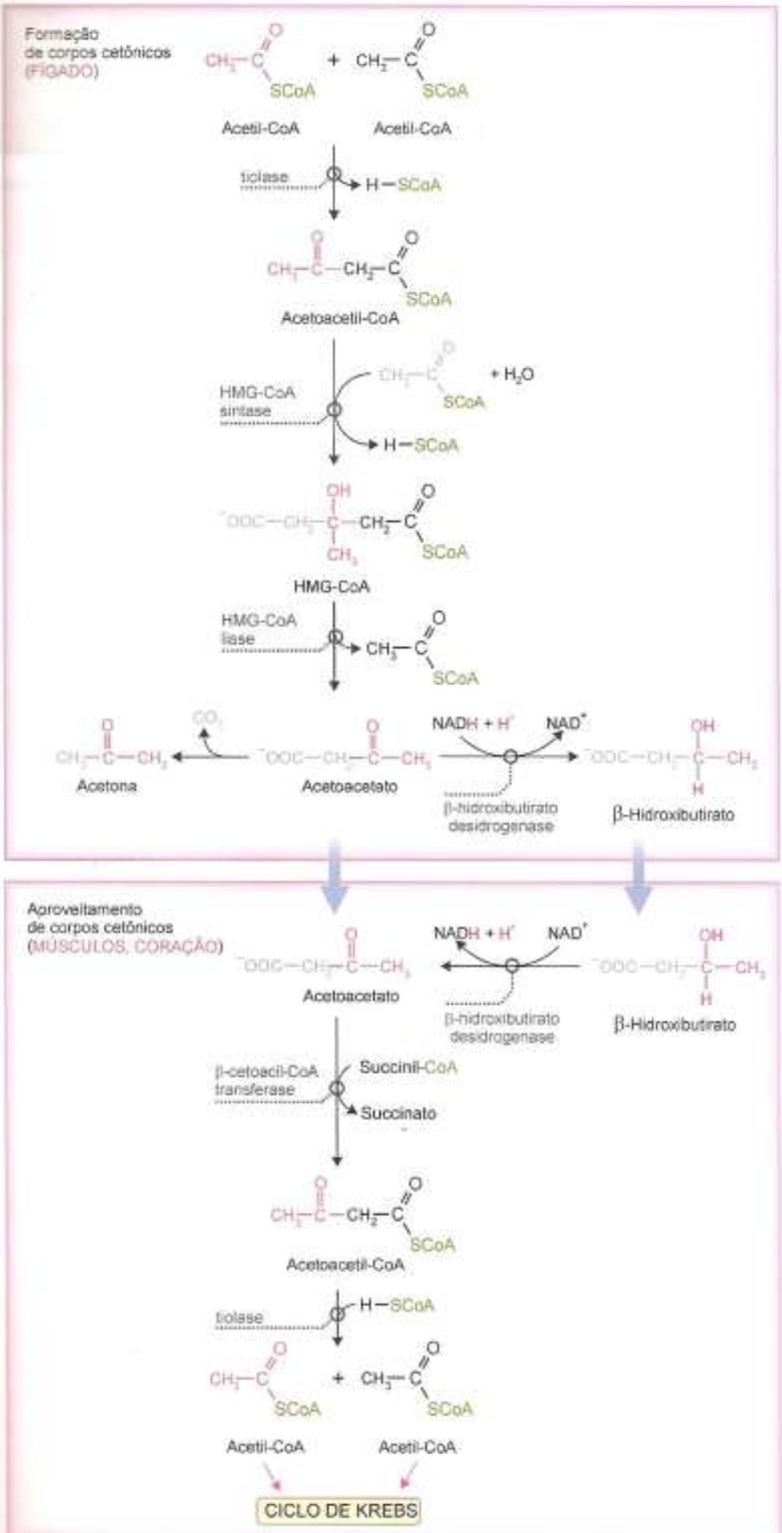


Fig. 16.6 Reações de formação de corpos cetônicos no fígado e reações que permitem seu aproveitamento por músculos e coração. As setas azuis representam transporte pelo sangue.

3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Sua clivagem origina acetoacetato e acetil-CoA. O acetoacetato produz β-hidroxibutirato e acetona.

Os corpos cetônicos são liberados na corrente sangüínea, e o acetoacetato e o β-hidroxibutirato são aproveitados como fonte de energia pelos tecidos extra-hepáticos, principalmente coração e músculos esqueléticos (Fig. 16.6). Estes órgãos são capazes de utilizar os dois compostos por possuírem uma enzima, ausente do fígado, a *β-cetoacil-CoA transferase*. Esta enzima mitocondrial catalisa a transferência da CoA de succinil-CoA para acetoacetato, formando acetoacetil-CoA e succinato. A acetoacetil-CoA é um intermediário do ciclo de Lynen e, por ação da tiolase, é cindida em duas moléculas de acetil-CoA, que podem ser oxidadas pelo ciclo de Krebs. O aproveitamento de β-hidroxibutirato é feito por sua prévia conversão em acetoacetato, catalisada pela *β-hidroxibutirato desidrogenase*. A acetona, por sua vez, não é metabolizada, sendo volatilizada nos pulmões. O cérebro, em situações de cetose acentuada, como jejum prolongado e diabetes, passa a oxidar corpos cetônicos. A alta concentração de corpos cetônicos na circulação induz a síntese da monocarboxilato translocase, análoga à permease mitocondrial, que permite a entrada destes compostos nas células do sistema nervoso central, e a síntese das enzimas necessárias para a sua oxidação.

Os corpos cetônicos constituem, portanto, uma forma de transferência de carbonos oxidáveis do fígado para outros órgãos. Normalmente, apenas uma pequena quantidade de acetil-CoA é convertida em corpos cetônicos no fígado, já que os seus destinos metabólicos principais são a oxidação (pelo ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons) ou o consumo pela síntese de lipídios. A decisão entre os dois caminhos dependerá da situação fisiológica vigente. A produção de corpos cetônicos é anormalmente elevada quando a degradação de triacilgliceróis não é acompanhada pela degradação de carboidratos. Realmente, para a oxidação eficiente de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs, há necessidade de níveis compatíveis de oxaloacetato, para promover a reação de condensação que inicia o ciclo. Na ausência de carboidratos, diminui a concentração de piruvato e, conseqüentemente, a sua conversão a oxaloacetato. Ainda mais, quando não há oferta de glicose, o organismo lança mão da gliconeogênese que consome oxaloacetato, obtido de aminoácidos, principalmente. A baixa concentração de oxaloacetato reduz drasticamente a velocidade de oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs: a acetil-CoA acumulada condensa-se, formando os corpos cetônicos. É o que ocorre quando há redução drástica da ingestão de carboidratos (jejum ou dieta) ou distúrbios do seu metabolismo (diabetes). Quando a produção ultrapassa o aproveitamento pelos tecidos extra-hepáticos, estabelece-se uma condição denominada *cetose*, caracterizada por uma concentração elevada de corpos cetônicos no plasma (*cetonemia*) e na urina (*cetonúria*). Um outro sintoma peculiar de indivíduos com cetose é o odor de acetona de seu hálito. Como os outros dois corpos cetônicos são ácidos, a cetonemia resulta em *acidose*, isto é, uma diminuição do pH sangüíneo.

16.4 METABOLISMO DO ETANOL

O etanol ingerido pelos seres humanos é rapidamente absorvido, a maior parte no intestino, sendo detectado no sangue minutos após a ingestão. Ele difunde-se através de membranas, distribuindo-se por todas as células, inclusive o cérebro. No fígado, o principal órgão responsável por seu metabolismo, é oxidado a acetaldeído pela *álcool desidrogenase* citossólica, em uma reação idêntica à última etapa da fermentação alcoólica por leveduras, ocorrendo, neste caso, em sentido inverso:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3-\overset{\overset{OH}{|}}{\underset{\underset{H}{|}}{C}}-H} + NAD^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Acetaldeído}}{CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-H} + NADH + H^+$$

O equilíbrio da reação favorece a formação de etanol, mas sua oxidação prossegue graças à conversão de acetaldeído em *acetato*, catalisada pela *acetaldeído desidrogenase* mitocondrial:

$$\underset{\text{Acetaldeído}}{CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-H} + H_2O + NAD^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Acetato}}{CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O^-} + NADH + 2\,H^+$$

O acetato, à semelhança dos ácidos graxos, origina acetil-CoA por ação de uma acil-CoA sintetase. Neste ponto, o metabolismo do etanol confunde-se com o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, que também originam acetil-CoA e NADH. Sendo assim, o consumo eventual de quantidades discretas de etanol significa consumo adicional de calorias, que devem ser somadas àquelas derivadas da ingestão de nutrientes no cômputo das calorias totais da dieta (Tabela 18.7, Seção 18.2.2). Todavia, quando há ingestão continuada de etanol, nem sequer o seu conteúdo calórico é aproveitado pelo organismo. A ingestão de etanol a longo prazo determina a indução de uma via minoritária de oxidação de etanol que se processa sem rendimento energético. Esta via é catalisada por um sistema enzimático localizado no retículo endoplasmático, do qual participa o citocromo P_{450}, uma monooxigenase que oxida etanol a acetaldeído com consumo de NADPH e O_2. A álcool desidrogenase é a principal responsável pelo metabolismo do etanol, após ingestão moderada e episódica; no consumo crônico e excessivo, o sistema do citocromo P_{450} torna-se mais importante e parece estar relacionado com o desenvolvimento de tolerância e dependência.

Os efeitos metabólicos do álcool ilustram a importância da concentração relativa das formas oxidada e reduzida de coenzimas, como um fator regulador do metabolismo. A oxidação de etanol produz níveis altos de NADH no citossol das células hepáticas, onde normalmente a concentração de NAD^+ é muito maior do que a de NADH. A alta concentração de NADH desloca a reação catalisada pela lactato desidrogenase, no sentido da formação de lactato (Fig. 16.7). A contínua conversão de piruvato a lactato impossibilita a gliconeogênese a partir de aminoácidos, porque eles devem ser primeiramente convertidos a piruvato e, depois, a glicose; ou seja, nesta situação, em vez de originarem glicose, são transformados em lactato. A concentração plasmática de lactato (ácido lático) pode aumentar de até cinco vezes, levando, portanto, a uma acidose. O impedimento da gliconeogênese pode ter conseqüências graves, já que a tomada de álcool, muitas vezes, não é acompanhada da ingestão de nutrientes, e, diminuída a reserva de glicogênio, pode ocorrer hipoglicemia e, finalmente, coma. A alta produção de acetil-CoA, associada à baixa disponibilidade de glicose, ocasiona cetose, que vem agravar, ainda mais, a acidose.



Fig. 16.7 A alta concentração de NADH (em vermelho) resultante da oxidação de etanol desloca a reação catalisada pela lactato desidrogenase no sentido da produção de lactato, impedindo que o piruvato derivado de aminoácidos possa ser convertido a glicose pela gliconeogênese (seta cruzada).

Os níveis mitocondriais de NADH também se elevam, devido à oxidação do acetaldeído, provocando a inibição do ciclo de Krebs e do ciclo de Lynen (Capítulo 20). No primeiro caso, resulta o acúmulo de acetil-CoA e sua conversão a corpos cetônicos, o que contribui para a acidose. No segundo caso, os ácidos graxos não são degradados e, por mecanismos ainda não muito claros, sua síntese é aumentada, levando ao acúmulo de lipídios no fígado. A esteatose resultante é, geralmente, o primeiro estágio da hepatopatia alcoólica. Com o consumo continuado, o quadro evolui para cirrose, caracterizada por redução de tecido hepático funcional, que, obviamente, acarreta complicações múltiplas.

Os dois sistemas de oxidação de etanol produzem *acetaldeído*, que atinge concentrações elevadas, causando efeitos tóxicos no fígado e, por extravasar para a circulação, também nos outros tecidos. Trata-se de uma substância muito reativa, que se liga covalentemente a proteínas, alterando a sua estrutura e provocando a sua inativação. Ademais, o metabolismo do etanol pela via do citocromo P_{450}, que utiliza oxigênio, gera radicais livres e consome NADPH, prejudicando a regeneração de glutationa, um importante antioxidante — o dano a macromoléculas é ampliado. Estas moléculas modificadas induzem uma reação imune, que tem sido implicada na patogênese da doença hepática do alcoolismo. Os efeitos metabólicos do etanol a longo prazo ainda são mal compreendidos, especialmente aqueles que induzem a dependência.

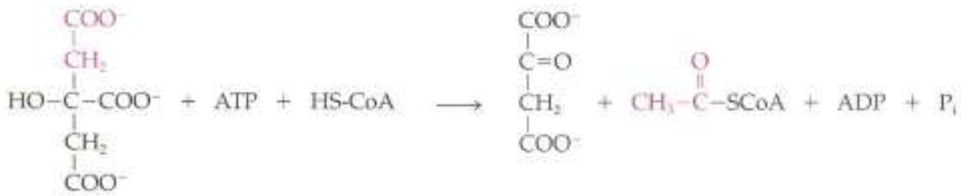
O consumo abusivo de álcool constitui um grave problema social e de saúde pública. Uma parcela significativa dos gastos totais com saúde é consumida pela assistência médica aos danos causados pelo alcoolismo — doença crônica, lesões traumáticas decorrentes de acidentes no trânsito, de agressões físicas etc. Além do mais, é responsável por um alto índice de óbitos. A ingestão de álcool durante a gravidez tem efeito deletério sobre o desenvolvimento do feto, particularmente do sistema nervoso central. É uma das principais causas determinantes de retardamento mental e perda da visão em crianças.

16.5 SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS

A primeira etapa da síntese de ácidos graxos é o transporte de acetil-CoA para o citossol

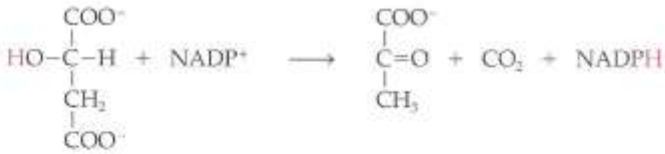
Nos seres humanos, a maior parte da produção endógena de ácidos graxos ocorre no fígado e, em menor extensão, no tecido adiposo. Os ácidos graxos são sintetizados a partir de carboidratos, principalmente, e do excedente de proteínas da dieta. Na via que leva à sua produção, o substrato inicial é a acetil-CoA e o produto final é o ácido palmítico. A síntese ocorre no citossol, para onde deve ser transportada a acetil-CoA formada na mitocôndria, fundamentalmente a partir de piruvato, pelo complexo piruvato desidrogenase. Como a membrana interna da mitocôndria é impermeável à acetil-CoA, os carbonos do grupo acetila são transportados sob a forma de citrato.

Algumas considerações preliminares sobre a regulação de vias metabólicas, assunto da Parte 4, tornam-se necessárias. A síntese de ácidos graxos é sujeita a diversos mecanismos de controle, mas ocorre, invariavelmente, quando a carga energética celular é alta (razão ATP/ADP alta) e a acetil-CoA disponível pode ser armazenada como gordura. Os carboidratos e proteínas, os precursores dos ácidos graxos, são degradados a acetil-CoA e oxaloacetato, que sofrem condensação, formando citrato, por ação da primeira enzima do ciclo de Krebs, a citrato sintase (Fig. 16.8). Na condição considerada, o citrato não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs em virtude da inibição da isocitrato desidrogenase (Seção 20.5) e é transportado para o citossol pela tricarboxilato translocase, onde é cindido em oxaloacetato e acetil-CoA, à custa de ATP, numa reação catalisada pela *citrato liase*:



Citrato Oxaloacetato Acetil-CoA

O oxaloacetato é reduzido a malato pela *malato desidrogenase* citossólica, uma isoenzima da malato desidrogenase mitocondrial. O malato é substrato da *enzima málica* em uma reação que produz piruvato e NADPH:



Malato Piruvato

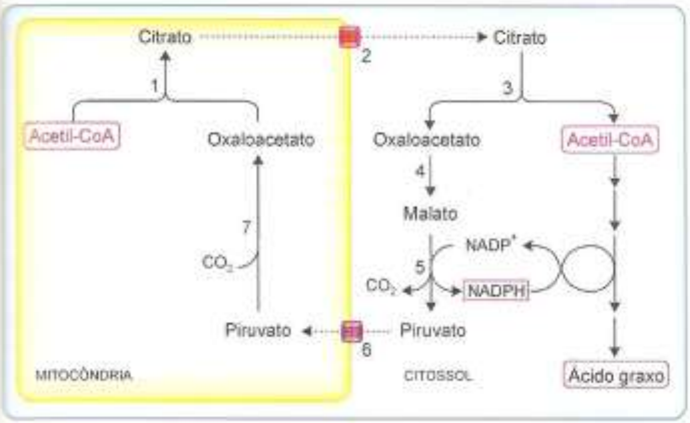


Fig. 16.8 Transporte do grupo acetila da acetil-CoA, sob a forma de citrato, da mitocôndria para o citossol. As enzimas e as translocases (da membrana interna da mitocôndria) que participam do processo são: (1) citrato sintase, (2) tricarboxilato translocase, (3) citrato liase, (4) malato desidrogenase, (5) enzima málica, (6) piruvato translocase e (7) piruvato carboxilase. As setas tracejadas indicam transporte através de translocases.

O piruvato, através da piruvato translocase, retorna à mitocôndria, onde é convertido a oxaloacetato, por ação d piruvato carboxilase.

O resultado final desta seqüência de reações é, portanto, o transporte dos carbonos da acetil-CoA (sob a forma d citrato), com gasto de ATP, da mitocôndria para o citossol e, ainda, a produção de NADPH. Acetil-CoA e NADP ambos no citossol, podem, então, ser utilizados para formar ácidos graxos. O NADPH, que também é fornecido p via das pentoses fosfato, constitui o agente redutor desse processo.

A síntese de ácidos graxos tem acetil-CoA e malonil-CoA como doadores de carbonos e NADPH como agente redutor

A síntese de ácidos graxos consiste na união seqüencial de unidades de dois carbonos: a primeira unidade é pro niente de *acetil-CoA*, e todas as subseqüentes, de *malonil-CoA*.

A malonil-CoA é formada por carboxilação de acetil-CoA, em uma reação catalisada pela *acetil-CoA carboxilase*, qu tem como grupo prostético a *biotina*. O mecanismo de ação da enzima é semelhante ao de outras carboxilases biot dependentes, como a piruvato carboxilase e a propionil-CoA carboxilase. Em aves e mamíferos, a forma cataliticame ativa da acetil-CoA carboxilase é um polímero filamentoso, resultante da associação de protômeros inativos. A polim rização e, portanto, a ativação da enzima, constitui um ponto importante de regulação da síntese de ácidos graxos.

$$\underset{\text{Acetil-CoA}}{CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-SCoA} + ATP + HCO_3^- \longrightarrow \underset{\text{Malonil-CoA}}{^-OOC-CH_2-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-SCoA} + ADP + P_i + H^+$$

A síntese de ácidos graxos é catalisada por um sistema enzimático denominado *sintase de ácidos graxos*. Faz parte d sintase uma pequena proteína não-enzimática, designada *proteína carregadora de acila* ou *ACP* (*Acyl-Carrier Protei*), qual está sempre ligada a cadeia do ácido graxo em crescimento. O ACP tem como grupo prostético um derivado d ácido pantotênico, a *fosfopanteteína*, também componente da coenzima A (Fig. 16.9). A longa cadeia de fosfopantete do ACP transporta o substrato entre os diferentes centros ativos componentes da sintase, à semelhança da atuação d ácido lipóico no complexo piruvato desidrogenase.

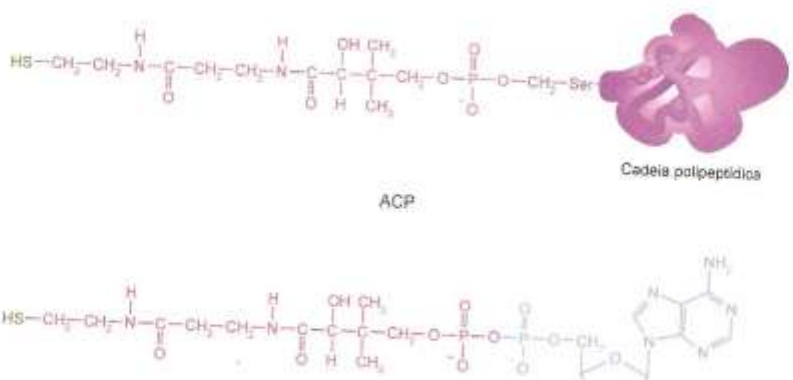


Fig. 16.9 O ACP, como a coenzima A, une-se a grupos acila por ligação tioéster com a sulfidrila terminal (assinalada em verde) d grupo fosfopanteteína (em vermelho). A fosfopanteteína está ligada a um resíduo de serina da cadeia polipeptídica do ACP (er roxo) e ao grupo fosfato da 3'-fosfoadenosina (em azul), componente da coenzima A.

A síntese (Fig. 16.10) inicia-se com a transferência do grupo acetila da acetil-CoA para o ACP, catalisada pela *acetil-CoA-ACP transacilase* (enzima 1); em seguida, a acetila é transferida para o grupo SH de um resíduo de cisteína de

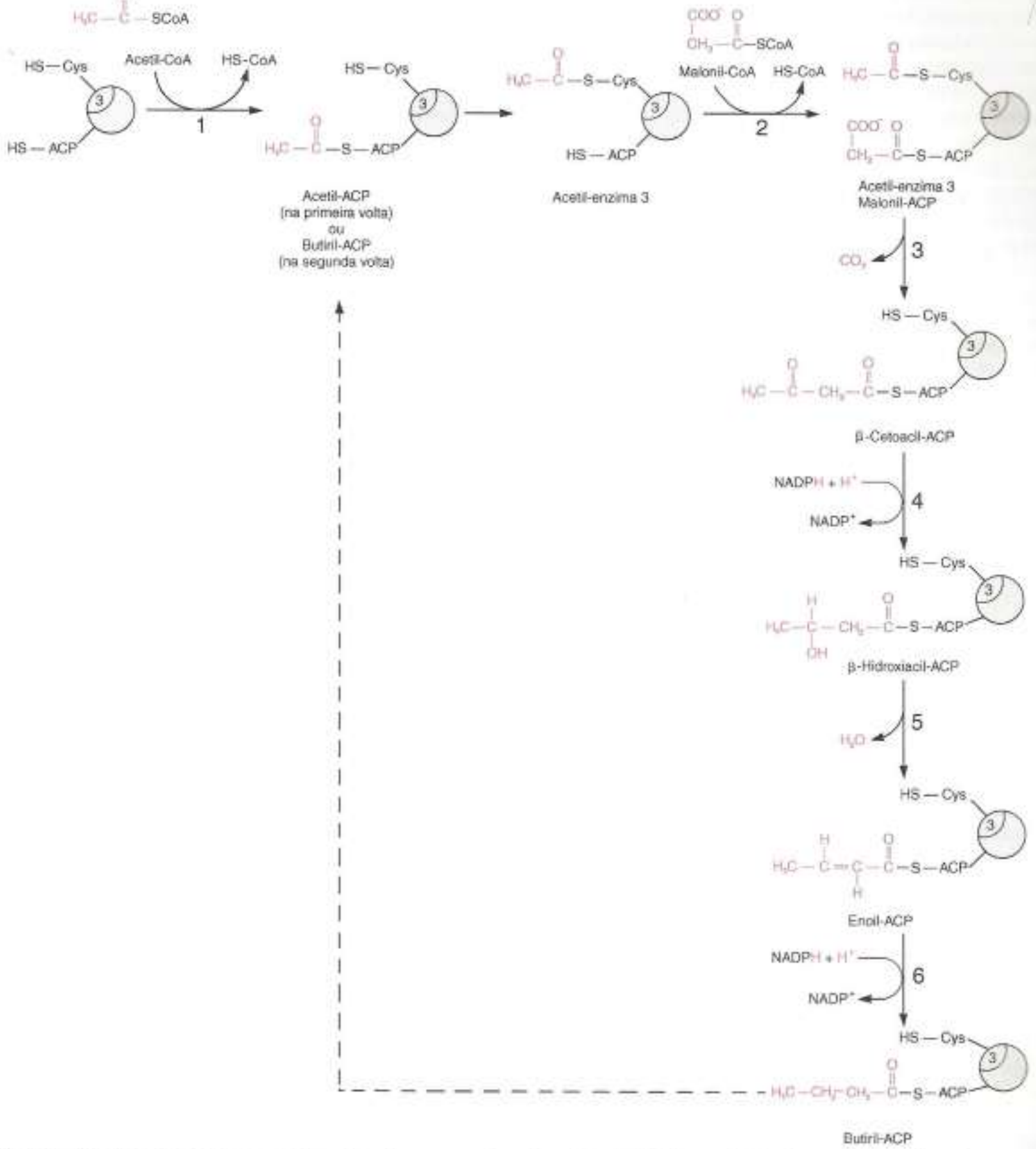


Fig. 16.10 Reações catalisadas por sintases de ácidos graxos. As enzimas (ou atividades enzimáticas) constituintes das sintases são: (1) acetil-CoA-ACP transacilase, (2) malonil-CoA-ACP transacilase, (3) β-cetoacil-ACP sintase, (4) β-cetoacil-ACP redutase, (5) β-hidroxiacil-ACP desidratase, (6) enoil-ACP redutase e (7) tioesterase (esta enzima não consta do esquema). A sintase de ácidos graxos está representada por uma esfera, na qual estão destacados o ACP, com sua sulfidrila terminal, e a β-cetoacil-ACP sintase (enzima 3), com o grupo SH de um de seus resíduos de cisteína. A figura mostra o primeiro ciclo de síntese, que leva à formação de butiril-ACP. Para o alongamento da cadeia carbônica (seta pontilhada), o butiril-ACP, sintetizado no final da primeira volta, sofre a mesma seqüência de reações (enzimas 2 a 6) que o acetil-ACP: o grupo butirila é transferido para o grupo SH da enzima 3, como ocorreu com o grupo acetila no início da primeira volta, prosseguindo as reações do mesmo modo que no primeiro ciclo de síntese.

outra enzima da sintase, a β-cetoacil-ACP sintase (enzima 3). O ACP, agora livre, pode receber o grupo malonila da malonil-CoA, formando malonil-ACP, por ação da *malonil-CoA-ACP transacilase* (enzima 2). Segue-se uma condensação dos grupos acetila e malonila, catalisada pela *β-cetoacil-ACP sintase* ou *enzima de condensação* (enzima 3), originando um β-cetoacil-ACP de quatro carbonos, com liberação de CO_2. Este CO_2 é exatamente aquele utilizado na carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA. Por isso, apesar de CO_2 ser imprescindível à síntese de ácidos graxos, seu átomo de carbono não aparece no produto. O fato de a condensação processar-se com uma descarboxilação faz com que esta reação seja acompanhada de uma grande queda de energia livre, dirigindo-a no sentido da síntese. Justifica-se assim o gasto inicial de ATP para produzir malonil-CoA a partir de acetil-CoA: a utilização do precursor de três carbonos contorna a condensação termodinamicamente desfavorável de duas moléculas de dois carbonos.

O β-cetoacil-ACP de quatro carbonos formado sofre redução, desidratação e nova redução, catalisadas, respectivamente, por *β-cetoacil-ACP redutase* (enzima 4), *β-hidroxiacil-ACP desidratase* (enzima 5) e *enoil-ACP redutase* (enzima 6). As duas redutases usam NADPH como doador de elétrons. Neste ponto, termina o primeiro ciclo de síntese, com a formação de *butiril-ACP*.

Para prosseguir o alongamento da cadeia — por adição de unidades de dois carbonos fornecidos por malonil-CoA — o grupo butirila é transferido para o SH da β-cetoacil-ACP sintase (à semelhança do que ocorreu com o grupo acetila), liberando o ACP, que pode, então, receber outro grupo malonila. A repetição do ciclo por mais seis voltas, perfazendo um total de *sete* voltas, leva à formação de *palmitoil-ACP*, que é reconhecido pela *tioesterase* (enzima 7): a ligação tioéster do substrato é hidrolisada, liberando o *ácido palmítico*, o produto mais usual da sintase de ácidos graxos.

A síntese de ácido palmítico (16 C), no total, requer: 1 acetil-CoA, 7 malonil-CoA, 7 ATP consumidos na formação de 7 malonil-CoA a partir de 7 acetil-CoA e 14 NADPH utilizados nas 7 voltas da síntese.

O NADPH tem duas origens: provém da reação catalisada pela enzima málica e das reações da via das pentoses fosfato catalisadas por desidrogenases, que sofrem uma regulação paralela à regulação da síntese de ácidos graxos. A importância relativa entre as duas fontes de poder redutor depende do tecido considerado. Nos vegetais fotossintéticos, a síntese de ácidos graxos ocorre nos cloroplastos, onde também é produzido NADPH, pelas reações da fase clara da fotossíntese.

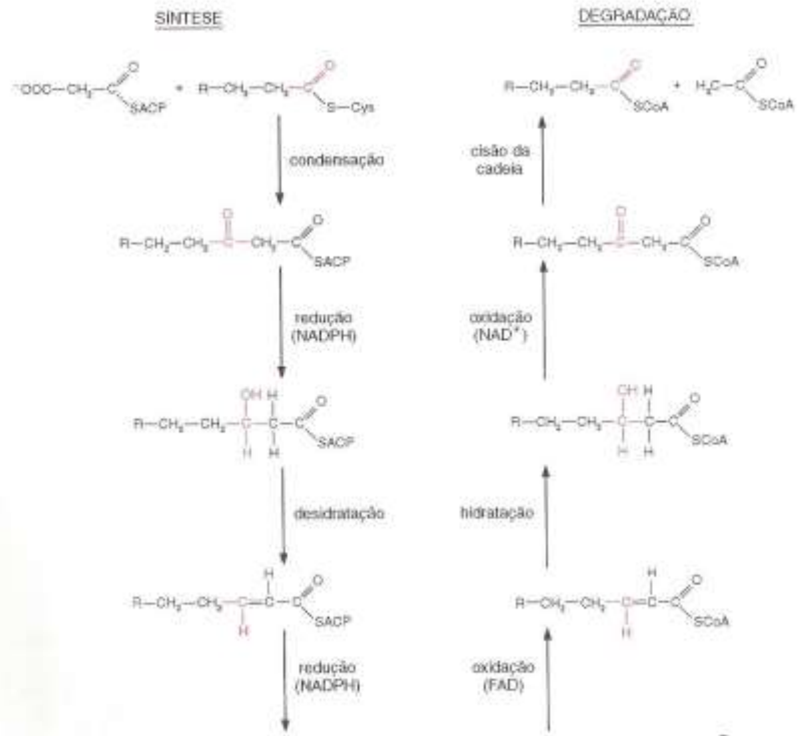


Fig. 16.11 Comparação entre a síntese e a degradação de um ácido graxo — os dois processos compreendem os mesmos tipos de reações, ocorrendo, todavia, em sentido e seqüência opostos.

A seqüência dos *tipos de reações* da síntese de um ácido graxo (condensação, redução, desidratação e redução) é oposta à seqüência da oxidação de um ácido graxo pelo ciclo de Lynen (oxidação, hidratação, oxidação e cisão da cadeia carbônica) (Fig. 16.11). A despeito disto, uma via não é o inverso da outra: elas diferem quanto às enzimas e coenzimas utilizadas, ao compartimento celular onde se processam e ao suporte da cadeia carbônica (ACP ou CoA). Em resumo, os processos de síntese e de degradação de ácidos graxos são absolutamente distintos, como habitualmente acontece no metabolismo.

A organização estrutural das sintases de ácidos graxos varia conforme o organismo em questão, mas as reações catalisadas são as mesmas. Nas bactérias e plantas, as enzimas responsáveis pela síntese são entidades independentes. Nos animais, a sintase é composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas associadas em um dímero. O que torna notável esta sintase é o fato de ela ser uma *enzima multifuncional*. Tal termo é aplicado para designar enzimas que apresentam várias atividades catalíticas, cada qual associada a um domínio específico da proteína. Este é exatamente o caso da sintase dos animais, que apresenta, em cada uma das duas cadeias polipeptídicas, as mesmas atividades enzimáticas encontradas nas bactérias, além do ACP. Todavia, a enzima dos animais deixa de ser funcional após a dissociação dos monômeros, porque as atividades catalíticas dependem de interações entre as duas cadeias; o exato mecanismo destas interações ainda não foi elucidado. A presença de enzimas multifuncionais traz, naturalmente, grande eficiência ao processo de síntese.

A síntese de ácidos graxos nos animais ocorre em muitos tecidos, verificando-se uma variação entre as diferentes espécies quanto ao tecido onde ela é mais relevante. Nos seres humanos, a maior parte dos ácidos graxos são produzidos pelo fígado a partir de carboidratos da dieta e exportados para os outros tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas.

A regulação da síntese de ácidos graxos será analisada no Capítulo 20.

16.6 ALONGAMENTO E INSATURAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS — ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Alguns ácidos graxos insaturados são essenciais para os mamíferos

Os lipídios dos animais e vegetais são muito ricos em ácidos graxos insaturados. Eles são componentes de fosfolipídios estruturais das membranas celulares, sendo, portanto, indispensáveis para a organização das membranas e para a ocorrência das funções a elas associadas. Além de determinarem a fluidez adequada das membranas celulares e a integridade e a resistência dos capilares sangüíneos, participam também do transporte de colesterol. Determinados ácidos graxos insaturados, que não podem ser sintetizados pelas células de mamíferos, destacam-se ainda mais, por originarem moléculas reguladoras (Fig. 16.13).

O ácido palmítico é o precursor utilizado para a formação de ácidos graxos saturados mais longos ou insaturados. Os sistemas enzimáticos de mamíferos incumbidos do alongamento situam-se no retículo endoplasmático e na mitocôndria. Ambos os sistemas promovem adições sucessivas de unidades de dois carbonos, por meio de uma reação de condensação, seguida por redução, desidratação e nova redução, ou seja, a mesma seqüência de etapas que levam à síntese de palmitato. Na via que ocorre no retículo endoplasmático, o substrato doador de carbonos é malonil-CoA e o agente redutor, NADPH; na mitocôndria, o alongamento utiliza acetil-CoA, NADH e NADPH.

As células animais têm uma capacidade de sintetizar ácidos graxos insaturados muito menor do que as células vegetais. Os mamíferos, incluindo os seres humanos, dispõem de *dessaturases* que produzem insaturações *apenas* nas posições Δ4, Δ5, Δ6 e Δ9, não havendo possibilidade de introdução de duplas ligações entre carbonos mais distantes da carboxila do que C9, ou seja, entre este carbono e o carbono ω. Todavia, ácidos graxos contendo insaturações além de C9, como, por exemplo, Δ12 (ω-6) e Δ15 (ω-3), são imprescindíveis para esses organismos. Tais ácidos graxos são obtidos de plantas, que têm dessaturases capazes de sintetizar essas duplas ligações.

As dessaturases de mamíferos fazem parte de um sistema enzimático ligado ao retículo endoplasmático, que inclui *citocromo* b_5 e requer NADH e O_2. Este sistema produz os ácidos graxos monoinsaturados mais comuns nos tecidos animais: *palmitoleico* (ω-7) e *oleico* (ω-9), por meio da introdução de uma dupla ligação na posição Δ9 do ácido palmítico e esteárico, respectivamente.

As células vegetais são capazes de adicionar uma dupla ligação Δ12 ao ácido oleico, convertendo-o em *ácido linoleico* (18:2 Δ9,12 ω-6), que sofre uma insaturação adicional (Δ15) e origina o *ácido α-linolênico* (18:3 Δ9,12,15 ω-3) (Fig. 16.12).

Os ácidos graxos que não podem ser sintetizados pelos mamíferos devem ser obtidos da alimentação, sendo, por isto, ditos *essenciais*. Os ácidos graxos reconhecidamente essenciais para os seres humanos são os *ácidos linoleico* (ω-6) e *α-linolênico* (ω-3). A partir dos essenciais, o organismo humano sintetiza, por meio de reações alternadas de dessaturação e alongamento, duas famílias de ácidos graxos mais longos e com maior número de insaturações: a família ω-6, derivada do ácido linoleico, e a família ω-3, do ácido α-linolênico.

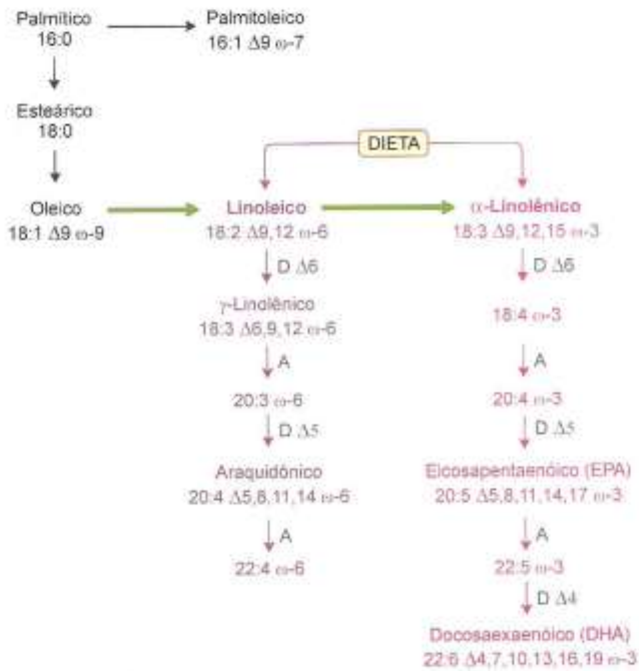


Fig. 16.12 Síntese de ácidos graxos por alongamento e des-saturação do ácido palmítico. As conversões que ocorrem apenas nos vegetais estão indicadas por setas verdes. Os ácidos linoleico (ω-6) e α-linolênico (ω-3) são essenciais para os seres humanos, devendo ser fornecidos pela dieta. Os ácidos graxos essenciais originam os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa das classes ω-6 (em roxo) e ω-3 (em vermelho), por meio de reações de dessaturação — catalisadas pelas dessaturases (D) Δ6, Δ5 e Δ4 — e de alongamento (A).

A dessaturação do ácido linoleico (Fig. 16.12) produz o *ácido γ-linolênico* (18:3 Δ6,9,12 ω-6). Este ácido graxo sofre alongamento de dois carbonos que resulta em alteração da posição das insaturações — deslocamento de dois carbonos a partir da carboxila — e formação de um intermediário 20:3 Δ8,11,14 ω-6. A quarta insaturação introduzida é a Δ5, originando o *ácido araquidônico* (20:4 Δ5,8,11,14 ω-6), que é o ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa mais abundante nas membranas da maioria das células humanas.

O ácido α-linolênico (ω-3) também é submetido a reações de insaturação e alongamento, formando diversos derivados, dentre os quais se salientam os ácidos *eicosapentaenóico* (*EPA*, da denominação inglesa, 20:5 ω-3) e *docosaexaenóico* (*DHA*, 22:6 ω-3), por serem particularmente abundantes no sistema nervoso central e retina. O ácido α-linolênico é o principal ácido graxo essencial do tipo ω-3 da dieta humana; sua conversão em EPA e DHA, em quantidades adequadas para sustentar o desenvolvimento normal do organismo humano, em especial do cérebro e da retina, é controversa. Deste modo, as necessidades de ácido α-linolênico na dieta são, ainda, obscuras.

As fontes dietéticas de ácidos graxos essenciais serão analisadas no Capítulo 18.

As deficiências de ácidos graxos essenciais ω-3 e/ou ω-6 acarretam diversas síndromes que podem ser fatais. Os mecanismos bioquímicos envolvidos — além, naturalmente, da alteração do perfil lipídico do organismo, principalmente do sistema nervoso — não estão estabelecidos, mas podem incluir desde alterações da atividade enzimática e de sistemas transportadores, até a modulação da expressão gênica. Um dos destinos metabólicos conhecidos dos ácidos graxos essenciais é a sua conversão em compostos fisiologicamente importantes, como será analisado a seguir.

Os eicosanóides são sintetizados a partir dos ácidos graxos essenciais

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa das famílias ω-6 e ω-3, produzidos a partir dos ácidos graxos essenciais, são convertidos em compostos estruturalmente relacionados: *prostaglandinas*, *prostaciclinas*, *tromboxanas* e *leucotrienos*. As quatro famílias de substâncias são chamadas, conjuntamente, de *eicosanóides*, por terem 20 carbonos (*eikosi*, em grego, significa vinte).

Os precursores mais importantes de eicosanóides são os ácidos araquidônico (ω-6) e eicosapentaenóico (EPA, ω-3), que são constituintes de fosfolipídios de membrana. Por isto, a síntese de eicosanóides inicia-se com a liberação destes ácidos graxos da bicamada lipídica, por meio de hidrólise, catalisada por fosfolipases específicas; o processo ocorre em resposta a lesão, inflamação e outros estímulos. A via de síntese apresenta uma bifurcação: um ramo produz

prostaglandinas (os primeiros eicosanóides descobertos), prostaciclinas e tromboxanas, e o outro, os leucotrienos (Fig. 16.13). Os eicosanóides sintetizados a partir de ácido araquidônico são distintos daqueles sintetizados a partir de EPA e, naturalmente, com efeitos fisiológicos também diversos. O eicosanóide produzido dependerá, portanto, das enzimas presentes nas células consideradas e do tipo de ácido graxo existente na membrana, característica esta que sofre influência da composição de ácidos graxos da dieta.

Os eicosanóides são produzidos pela maioria das células nucleadas e atuam em concentrações tão baixas quanto os hormônios; ao contrário destes, não são transportados pela circulação e exercem seu efeito onde são produzidos. Participam da regulação de processos fisiológicos muito diversificados: contração de músculos lisos — e, conseqüentemente, regulação da pressão arterial, dilatação dos brônquios, contração uterina etc. —, reação inflamatória, manifestação de dor e febre, coagulação sangüínea e outros. Essas substâncias têm despertado enorme interesse médico, não somente devido ao seu largo espectro de ação, mas também por atuarem em concentrações extremamente baixas e terem meia-vida muito curta; tais características viabilizam a sua utilização para o desenvolvimento de agentes farmacológicos potentes.

Com efeito, diversos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos interferem no metabolismo de eicosanóides (Fig. 16.13). Os *corticosteróides*, por exemplo, inibem a fosfolipase, reduzindo a disponibilidade de ácido araquidônico e afetando, portanto, a síntese de todos os eicosanóides dele derivados. Já os antiinflamatórios não-esteroídicos, como aspirina (mecanismo de ação na Seção 5.7), *indometacina*, *fenilbutazona*, *ibuprofen*, *diclofenaco*, *piroxicam* etc., bloqueiam apenas a subdivisão da via que origina prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanas, não atuando sobre o metabolismo dos leucotrienos. Estes fármacos inibem a atividade de *ciclooxigenase* (COX) da enzima que catalisa a ciclização do ácido araquidônico (ligação dos carbonos 8 e 12) e a incorporação de oxigênio. A aspirina, em doses baixas, tem sido utilizada com sucesso na prevenção de enfartes do miocárdio, por evitar a formação de trombos (coágulos); este efeito é devido à inibição da síntese de tromboxanas (praticamente, o único tipo de eicosanóide sintetizado por plaquetas), que estimulam a agregação de plaquetas, o passo inicial da coagulação sangüínea.

As prostaglandinas, por estimularem a contração uterina, têm sido empregadas para a indução do parto normal ou como agentes abortivos. Os leucotrienos são mediadores de processos alérgicos agudos, como a reação anafilática e a asma; agentes terapêuticos que inibem a sua síntese, e a constrição brônquica resultante, são adotados no tratamento da asma.

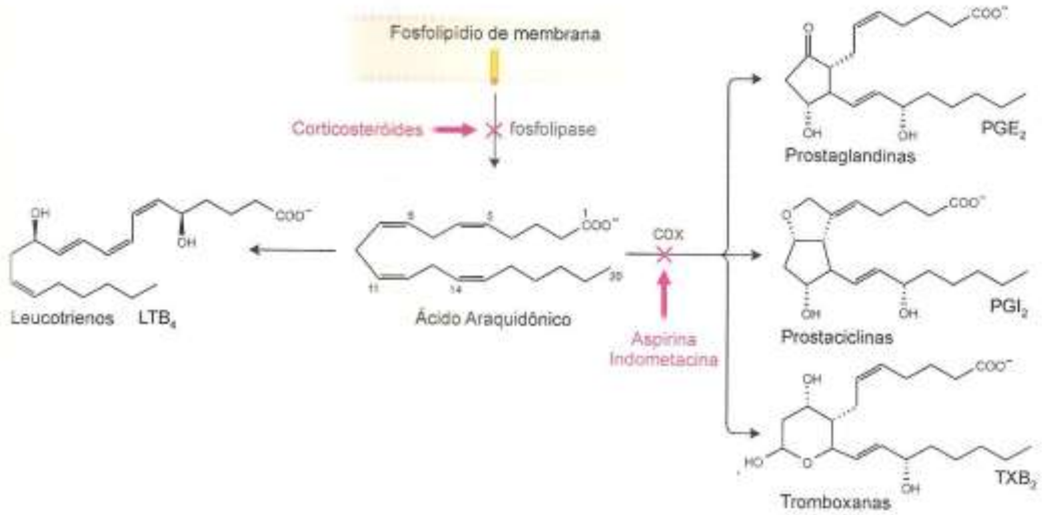


Fig. 16.13 Esquema simplificado da síntese de eicosanóides a partir de ácido araquidônico, que deve ser primeiramente liberado de fosfolipídios de membrana, por ação da fosfolipase. A figura mostra a estrutura de um membro representativo de cada família de eicosanóides e os pontos de atuação de agentes antiinflamatórios. Os corticosteróides inibem a fosfolipase, bloqueando a síntese de todos os eicosanóides derivados de ácido araquidônico. Antiinflamatórios não-esteroídicos, como aspirina, indometacina etc., inibem a atividade de ciclooxigenase (COX) da enzima que inicia a ramificação da via que leva à síntese de prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanas, que, então, não se processa; não interferem na produção de leucotrienos.

16.7 SÍNTESE DE TRIACILGLICERÓIS

Os precursores dos triacilgliceróis são glicerol 3-fosfato e acil-CoA

Os triacilgliceróis são sintetizados a partir de acil-CoA derivadas de ácidos graxos e glicerol 3-fosfato. No tecido adiposo, o glicerol 3-fosfato é formado por redução de diidroxiacetona fosfato, obtida a partir de glicose, que, portanto, é *imprescindível* para a síntese de triacilgliceróis. No fígado, existe uma via alternativa para obtenção de glicerol 3-fosfato: a fosforilação do glicerol, catalisada pela glicerol quinase (Fig. 16.14).

O glicerol 3-fosfato é acilado em duas etapas, formando *fosfatidato* (*diacilglicerol 3-fosfato*), que, por hidrólise do grupo fosfato, origina *diacilglicerol*. Estes dois últimos compostos são intermediários também da síntese de fosfolipídios. O triacilglicerol é obtido por acilação do diacilglicerol (Fig. 16.14).

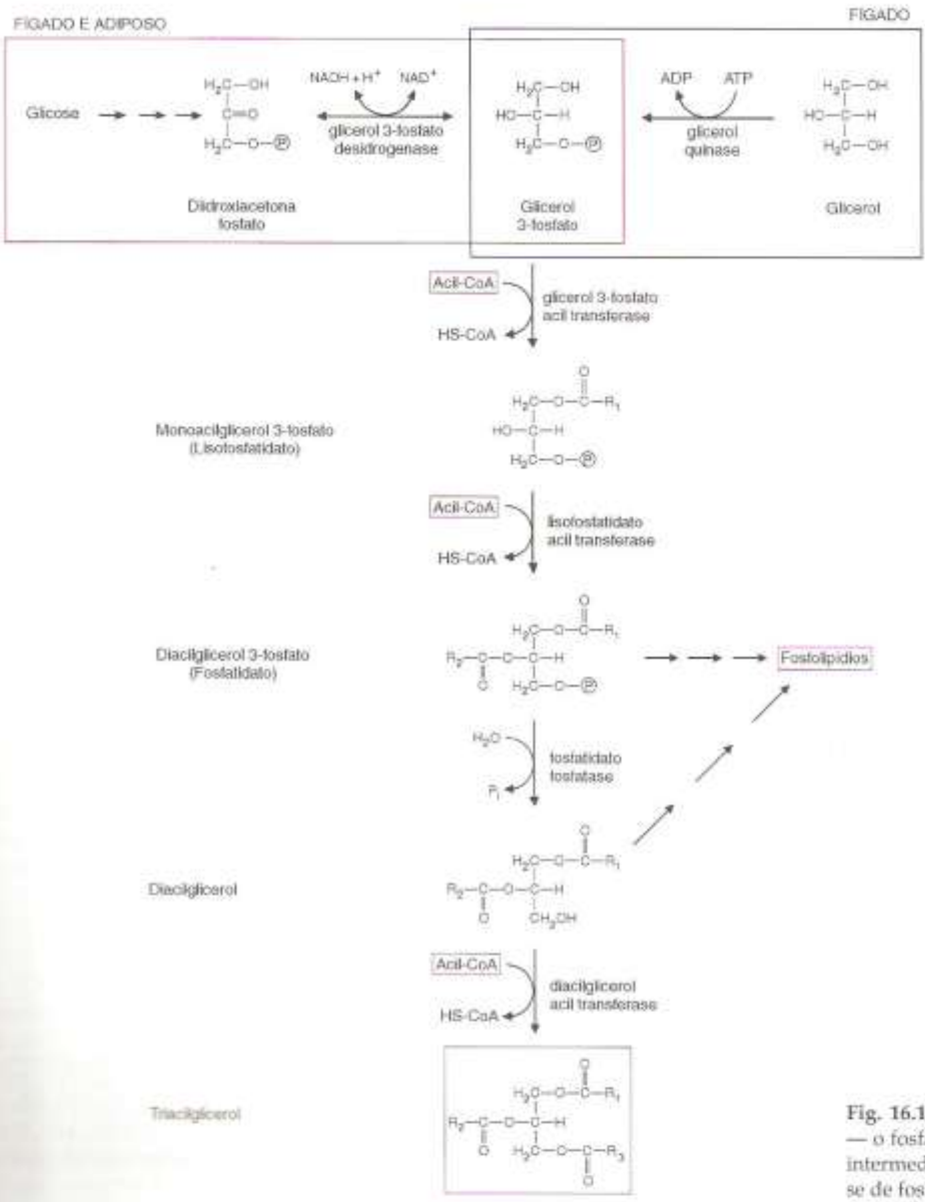


Fig. 16.14 Síntese de triacilgliceróis — o fosfatidato e o diacilglicerol são intermediários comuns à via de síntese de fosfolipídios.

O fígado e o tecido adiposo são "parceiros" no metabolismo de triacilgliceróis

A maioria dos tecidos dos seres humanos são capazes de esterificar ácidos graxos, formando triacilgliceróis, mas o fígado e o tecido adiposo são os principais responsáveis por esse processo. Os triacilgliceróis sintetizados no fígado são, na maior parte, incorporados em lipoproteínas plasmáticas, encarregadas da distribuição de ácidos graxos aos tecidos extra-hepáticos, o adiposo inclusive. O tecido adiposo encarrega-se da síntese e armazenamento de triacilgliceróis — formados a partir de ácidos graxos da dieta, transportados pelos quilomícrons, ou a partir daqueles sintetizados pelo fígado e pelo próprio tecido adiposo — e, ainda, da sua hidrólise, liberando ácidos graxos para uso interno ou para exportação a outros órgãos. Os processos de armazenamento ou mobilização de triacilgliceróis ocorrem, obviamente, em condições fisiológicas antagônicas e estão sujeitos a mecanismos opostos de regulação. ***A regulação completa destas vias será descrita no Capítulo 20.***

Os fosfolipídios, necessários para a biossíntese de membranas, são sintetizados, praticamente, por todas as células.

16.8 METABOLISMO DO COLESTEROL

O colesterol do organismo humano pode ser obtido por produção endógena ou a partir dos alimentos. A quantidade de colesterol sintetizado *de novo* varia de modo inverso com a quantidade ingerida. Um indivíduo adulto saudável, com dieta contendo baixo teor de colesterol, sintetiza cerca de 800 mg de colesterol por dia, que corresponde a cerca de 70% do colesterol total. Os principais órgãos responsáveis pela produção endógena de colesterol são o fígado e o intestino delgado.

A acetil-CoA é precursora de todos os átomos de carbono presentes no colesterol (C_{27}), e o agente redutor é o mesmo da síntese de ácidos graxos, ou seja, NADPH. As enzimas que catalisam a síntese de colesterol localizam-se no citossol e no retículo endoplasmático. A via é composta por dezenas de reações, que não serão descritas na sua totalidade, mas, sim, agrupadas em etapas que evidenciam o esquema básico de "montagem" da molécula de colesterol: a acetil-CoA forma unidades de cinco carbonos, com estrutura semelhante ao isopreno (Fig. 16.15), que se polimerizam em um intermediário linear, que, após ciclização, origina o colesterol.

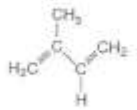


Fig. 16.15 Molécula de isopreno.

A síntese (Fig. 16.16 a) inicia-se com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, produzindo acetoacetil-CoA; esta condensa-se com outra molécula de acetil-CoA, produzindo *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA* (*HMG-CoA*). As enzimas que catalisam estas reações são, respectivamente, *tiolase* e *hidroximetilglutaril-CoA sintase* (*HMG-CoA sintase*), ambas citossólicas. Nos hepatócitos, estas duas enzimas são encontradas também nas mitocôndrias, e a HMG-CoA formada é precursora dos *corpos cetônicos*.

A HMG-CoA é a seguir reduzida a *mevalonato*, à custa de 2 NADPH, numa reação catalisada pela *HMG-CoA redutase*, uma enzima ligada ao retículo endoplasmático. Esta é a reação limitante da síntese de colesterol. O controle da atividade da HMG-CoA redutase será analisado na Seção 20.8.

O mevalonato (C_6) sofre duas fosforilações (Fig. 16.16 b), que consomem 3 ATP, e uma descarboxilação, originando a unidade isoprenóide, o *isopentenil-pirofosfato* (C_5). Além do colesterol, outros compostos importantes apresentam estrutura formada por múltiplos de unidades isoprenóides, como as vitaminas A, E e K, os carotenóides, a borracha, a clorofila e a coenzima Q.

Um total de 6 moléculas de isopentenil-pirofosfato são consumidas para formar *esqualeno* (C_{30}), o último intermediário linear da via (Fig. 16.16 c). A síntese de esqualeno processa-se por reações de isomerização, condensação, redução por NADPH e eliminação de pirofosfato.

A etapa final (Fig. 16.16 d) consiste na ciclização do esqualeno, que envolve reações complexas, muitas das quais ainda mal compreendidas. São mais de 20 reações, incluindo consumo de O_2 e NADPH, remoção de grupos metila e migração de duplas ligações, que levam, finalmente, à produção de colesterol.

A síntese de colesterol é, portanto, uma síntese redutiva, que ocorre com grande consumo de energia: para cada molécula produzida são gastos 18 ATP e dezenas de NADPH.

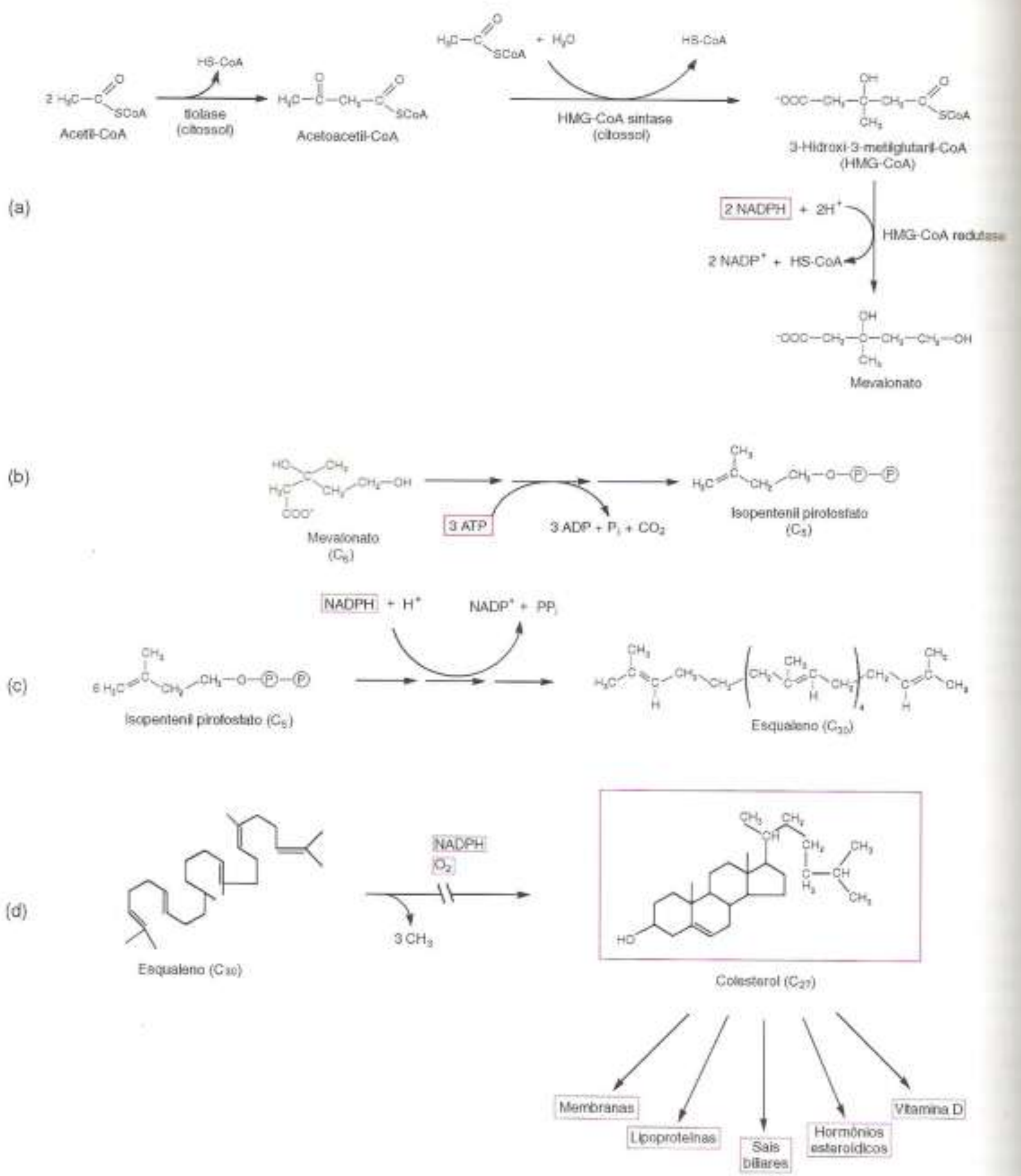


Fig. 16.16 Etapas da síntese de colesterol. a) A condensação de 3 moléculas de acetil-CoA produz HMG-CoA, que é reduzida a mevalonato. b) Mevalonato (C_6) é convertido na unidade isoprenóide, o isopentenil-pirofosfato (C_5), por fosforilação à custa de ATP e descarboxilação. c) Seis unidades isoprenóides formam o esqualeno, um composto linear de 30 carbonos, com redução por NADPH e produção de PP_i. d) A conversão de esqualeno em colesterol (C_{27}) envolve a ciclização de esqualeno, por meio de vários passos que incluem a perda de 3 grupos metila e o consumo de NADPH e O_2.

O colesterol, apesar de tão temido, é indispensável ao organismo humano

O colesterol, além de ser um componente estrutural de membranas, é precursor dos ácidos biliares, hormônios esteróides e da vitamina D. A despeito de desempenhar funções vitais, o colesterol tem sido considerado um "inimigo" da saúde, devido à correlação existente entre níveis plasmáticos aumentados de colesterol e ocorrência de aterosclerose. ***Este assunto será abordado junto à regulação do metabolismo do colesterol (Capítulo 20).***

Os *ácidos biliares* são esteróides di- ou triidroxilados, sintetizados no fígado a partir de colesterol, por reações que consomem NADPH, O_2, acetil-CoA e ATP. Os ácidos biliares, no pH fisiológico, ocorrem predominantemente na forma desprotonada, do que resulta a denominação mais apropriada de *sais biliares*; ambos os termos, todavia, costumam ser empregados. Nos seres humanos, os principais sais biliares formados no fígado são *colato* e *quenodesoxicolato* (*ácidos cólico e quenodesoxicólico*), que são secretados para a vesícula biliar, na sua maior parte, associados a glicina e a taurina por ligação amídica (Fig. 16.17). A bile contém, ainda, outros compostos, dentre os quais, colesterol. Em determinados distúrbios crônicos do metabolismo de lipídios, há um aumento da secreção de colesterol para a bile, onde ele pode precipitar e originar cálculos ("pedras"). A incidência de cálculos de colesterol é muito alta na população idosa do mundo ocidental.

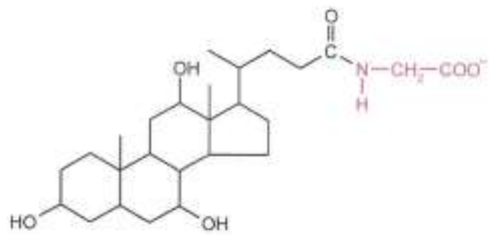


Fig. 16.17 Estrutura do glicocolato, derivado do colato por ligação com glicina (em vermelho).

Os sais biliares são secretados da vesícula biliar para a porção superior do intestino delgado (duodeno), onde têm papel fundamental na digestão de lipídios: por suas propriedades anfifílicas, são responsáveis pela emulsificação e solubilização dos lipídios e das vitaminas lipossolúveis, facilitando sua digestão e absorção.

A maior parte dos sais biliares é reabsorvida na porção inferior do intestino delgado (íleo) e retorna ao fígado, para novos ciclos de secreção. A parte restante é excretada nas fezes, depois de parcialmente degradada pelas bactérias intestinais. No organismo humano, o anel esteróide não pode ser degradado a CO_2 e H_2O, de modo que a formação de sais biliares é a única via de excreção de colesterol. A inibição da reabsorção dos sais biliares aumenta a conversão de colesterol em sais biliares; este é o princípio de ação de algumas drogas utilizadas clinicamente para reduzir o nível de colesterol plasmático (Seção 20.8).

Os principais hormônios esteróides (Fig. 16.18) são os *corticosteróides*, produzidos no córtex das glândulas supra-renais, e os *hormônios sexuais*, produzidos nas gônadas.

Os corticosteróides regulam o metabolismo de proteínas, carboidratos e eletrólitos. O *cortisol* (*hidrocortisona*) e seus derivados são largamente utilizados como agentes antiinflamatórios, por inibirem a síntese de eicosanóides.



Cortisol   Estradiol   Testosterona

Fig. 16.18 Estrutura de três hormônios esteróides. Notar a semelhança estrutural entre o estradiol (hormônio feminino) e a testosterona (hormônio masculino).

Os hormônios sexuais incluem a *testosterona*, o hormônio masculino, e os *estrógenos* e as *progestinas*, os hormônios femininos. Tais hormônios controlam a diferenciação dos órgãos sexuais e o desenvolvimento das características sexuais secundárias. Derivados sintéticos dos hormônios sexuais têm tido várias aplicações terapêuticas, que vão desde a contracepção até a reposição de estrógenos na pós-menopausa. Uma prática comum, mas condenável, é a utilização de derivados de hormônios sexuais masculinos, os chamados *esteróides anabolizantes*, para aprimorar o desempenho físico de atletas. Estes esteróides estimulam processos anabólicos, inclusive o aumento da massa muscular, mas acarretam sérios problemas ao organismo, como disfunção hepática e cardíaca, impotência etc.

BIBLIOGRAFIA

Albano E: Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* **32** (2):110-114, 2002.

Brosius U, Gartner J: Cellular and molecular aspects of Zellweger syndrome and other peroxisome biogenesis disorders. *Cell Mol Life Sci* **59** (6):1058-1069, 2002.

Garrow JS et al: *Human Nutrition and Dietetics*, 10th ed. Churchill Livingstone, 2001.

Ghisla S: Beta-oxidation of fatty acids. A century of discovery. *Eur J Biochem* **271** (3):459-461, 2004.

Graham IA, Eastmond PJ: Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog Lipid Res* **41** (2):156-181, 2002.

Innis SM: Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res* **30** (1):39-103, 1991.

Kim JJP, Miura R: Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. *Eur J Biochem* **271**:483-493, 2004.

Lieber CS: Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* **9** (1):1-35, 2005.

Michels PA et al: Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes. *Mol Membr Biol* **22** (1-2):133-145, 2005.

Moser H et al: Progress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Neurol* **17** (3):263-269, 2004.

Pierre K, Pellerin L: Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* **94** (1):1-14, 2005.

Uauy R et al: Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* **36** (9):885-895, 2001.

Wanders RJ: Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochim Biophys Acta* **1631** (2):119-135, 2003.

Wanders RJ et al: Peroxisomal fatty acid α- and β-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* **29** (Pt 2):250-267, 2001.

17

Metabolismo de Aminoácidos

As proteínas, como os demais compostos constituintes de um organismo, não são permanentes, estando em contínuo processo de degradação e síntese. Estima-se que, em um ser humano adulto com uma dieta adequada, haja uma renovação de aproximadamente 400 g de proteínas por dia. Em qualquer instante deste período, determinadas proteínas estão sendo degradadas e outras tantas estão sendo sintetizadas. A meia-vida das proteínas apresenta uma enorme variação (Tabela 17.1), mas os mecanismos que determinam velocidades diferentes de degradação para cada proteína são apenas parcialmente conhecidos. De qualquer modo, a manutenção da concentração de uma determinada proteína é obtida pela síntese desta proteína em quantidade equivalente à de sua degradação; embora existam flutuações transitórias, a concentração proteica geral mantém-se constante no indivíduo adulto e hígido.

Como a composição de aminoácidos das proteínas varia, o conjunto de aminoácidos originados das proteínas que estão sendo degradadas não é igual àquele necessário para compor as proteínas que estão sendo sintetizadas. Os aminoácidos excedentes não podem ser armazenados — eles são oxidados e seu nitrogênio, excretado. Um indivíduo adulto saudável, com uma dieta apropriada, elimina por dia uma quantidade de nitrogênio correspondente a 100 g de proteína aproximadamente. Como 400 g de proteínas devem ser renovados neste período, faltam os 100 g eliminados, que devem ser repostos pela alimentação.

Tabela 17.1 Meia-vida de proteínas

Proteína	Meia-vida[1] (dias)
Hemoglobina falciforme	12 minutos
Ornitina descarboxilase	12 minutos
HMG-CoA redutase	3 horas
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	5 horas
Glicoquinase	1,25
Acetil-CoA carboxilase	2
Alanina transaminase	2,5
Arginase	4
Aldolase	5
Citocromo b	5,4
Lactato desidrogenase	6
Citocromo c	6,3
Hemoglobina	120

[1]Meia-vida de uma proteína é o tempo após o qual metade das moléculas é degradada. Proteínas defectivas e enzimas reguladoras têm, em geral, meia-vida muito curta.

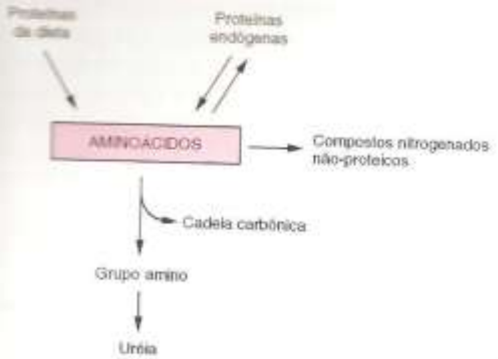


Fig. 17.1 A degradação das proteínas endógenas e da dieta origina um conjunto de aminoácidos, precursores das proteínas endógenas e de todos os outros compostos nitrogenados. Os aminoácidos excedentes são degradados, restando as respectivas cadeias carbônicas e o grupo amino, que é convertido em uréia.

O conjunto de aminoácidos presente nas células animais origina-se das proteínas exógenas (as da dieta, hidrolisadas no trato digestório) e das proteínas endógenas (hidrolisadas intracelularmente); 1/4 desse conjunto é derivado da primeira procedência e os 3/4 restantes, da segunda. O conjunto de aminoácidos é utilizado para a síntese de proteínas e de outras moléculas que contenham nitrogênio (Fig. 17.1). Com efeito, os aminoácidos são precursores de todos os compostos nitrogenados não-proteicos, que incluem as bases nitrogenadas dos nucleotídios (componentes dos ácidos nucleicos e coenzimas), os lipídios (fosfolipídios e glicolipídios) e os polissacarídios (quitina e glicosaminoglicanas) que contêm nitrogênio, as aminas e seus derivados (epinefrina, ácido γ-aminobutírico, histamina, carnitina, creatina, porfirina, tiroxina) etc. A quase totalidade dos seres vivos é incapaz de armazenar aminoácidos ou proteínas e, conseqüentemente, satisfeitas as necessidades de síntese, os aminoácidos excedentes são oxidados. Em um indivíduo adulto saudável, com uma dieta adequada, a oxidação de aminoácidos responde por 10-15% das necessidades energéticas.

17.1 DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS

A hidrólise de proteínas exerce um papel essencial em inúmeros processos fisiológicos que são controlados pela variação da concentração de proteínas específicas: ciclo celular, transcrição gênica, resposta inflamatória e muitos outros. Algumas proteínas devem estar presentes em apenas uma das fases do ciclo celular; outras, como as enzimas reguladoras das vias metabólicas, precisam ter suas concentrações ajustadas às variações das condições do organismo. Em alguns casos, como na regressão do tamanho do útero após o parto, o processo é extremamente acelerado. Adicionalmente, a degradação de proteínas é essencial para que proteínas "defeituosas" sejam eliminadas e não comprometam a homeostase celular. Alterações da estrutura proteica podem originar-se de mutações, erros no processo de síntese ou por danos sofridos no ambiente celular, causados por reação com agentes oxidantes etc.

A ligação com ubiquitina condena uma proteína à degradação

Há dois processos principais para a degradação proteica em células eucarióticas. O primeiro, mais restrito, é efetuado por proteases de lisossomos, as *catepsinas*, e é utilizado principalmente para a degradação de proteínas de membranas, proteínas extracelulares e proteínas de meia-vida longa.

O segundo processo, muito mais geral, ocorre no citossol e cumpre-se com a mediação de uma proteína chamada *ubiquitina*. Esta proteína, com 76 aminoácidos, está presente em todas as células eucarióticas e é altamente conservada, o que indica a sua importância. Para iniciar a degradação de uma proteína, o primeiro passo é sua ligação à ubiquitina, em uma seqüência de reações que ocorrem com gasto de ATP. A carboxila terminal da ubiquitina é unida por uma ligação semelhante à ligação peptídica, mas com o grupo ε-amino de um resíduo de lisina da proteína a ser degradada. Após esta ligação, outras moléculas de ubiquitina ligam-se à primeira, sempre com o mesmo tipo de ligação, porém, entre a carboxila terminal de uma molécula de ubiquitina e o grupo ε-amino de um determinado resíduo de lisina de outra molécula de ubiquitina. Diz-se, então, que a proteína está *ubiquitinada* e destinada inapelavelmente à degradação. A proteína ubiquitinada interage com um grande complexo proteolítico, o *proteassomo*, capaz de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo praticamente qualquer aminoácido. A própria ubiquitina resiste à hidrólise, podendo participar de outros ciclos proteolíticos.

A seleção da proteína a ser degradada é obtida, em parte, a partir de sua própria estrutura primária, mais precisamente, do aminoácido presente na extremidade amino-terminal. Certos aminoácidos estabilizam as proteínas, que

exibem, então, meias-vidas longas, da ordem de algumas dezenas de horas, enquanto outros atribuem às proteínas meias-vidas de minutos. Esta regra, todavia, não é válida para a degradação da maioria das proteínas. Outros indicadores são, certamente, necessários para o reconhecimento das proteínas a serem hidrolisadas.

Assim, ainda é bastante desconhecido o mecanismo de identificação de proteínas alteradas. Sabe-se apenas que ele é muito eficiente: a meia-vida da hemoglobina é de 120 dias, mas uma hemoglobina modificada, como a hemoglobina falciforme, tem a meia-vida reduzida para apenas 12 minutos.

17.2 DEGRADAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A oxidação de aminoácidos não é efetuada por uma via única, diferentemente do que acontece com os carboidratos e os lipídios. A degradação dos carboidratos processa-se pela glicólise — algumas reações específicas transformam qualquer deles em intermediários desta via. Situação semelhante ocorre com os ácidos graxos, componentes dos triacilgliceróis: quando a cadeia carbônica não é alifática e/ou contém ramificações, reações adicionais convertem-na em compostos intermediários do ciclo de Lynen. Como os aminoácidos são constituídos por cadeias laterais com estruturas variadas, sua oxidação processa-se por vias também variadas. Há, entretanto, um padrão seguido na oxidação de todos eles: inicialmente há remoção do grupo amino e, a seguir, oxidação da cadeia carbônica remanescente. Nos mamíferos, o grupo amino é convertido a *uréia* e as 20 cadeias carbônicas resultantes são convertidas a compostos comuns ao metabolismo de carboidratos e lipídios.

17.2.1 REMOÇÃO DO GRUPO AMINO DOS AMINOÁCIDOS

O grupo amino da maioria dos aminoácidos é coletado inicialmente como glutamato

O grupo amino da maioria dos aminoácidos — alanina, arginina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glutamato, isoleucina, leucina, tirosina, triptofano e valina — é retirado por um processo comum, que consiste na transferência deste grupo para o α-cetoglutarato, formando glutamato; a cadeia carbônica do aminoácido é convertida ao α-cetoácido correspondente:

$$\text{Aminoácido} + \alpha\text{-Cetoglutarato} \rightleftharpoons \alpha\text{-Cetoácido} + \text{Glutamato}$$

Este tipo de reação é catalisada por *aminotransferases*, também chamadas *transaminases*, enzimas presentes no citossol e na mitocôndria e que têm como coenzima *piridoxal-fosfato* (Fig. 17.2). Esta coenzima participa de diversas outras reações do metabolismo de aminoácidos e é derivada da vitamina B_6 (piridoxina).

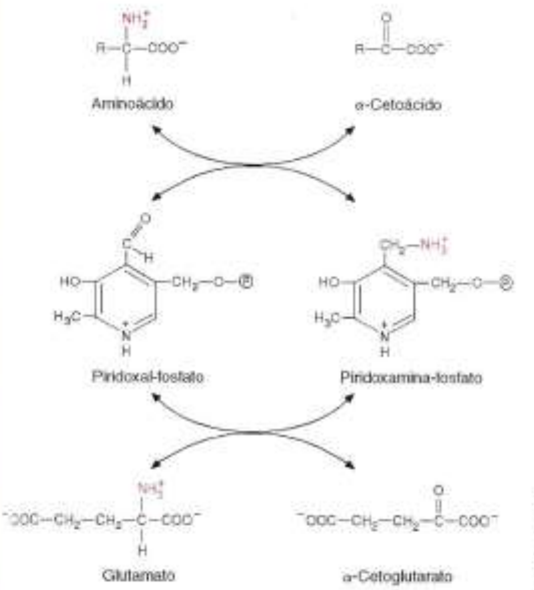


Fig. 17.2 Reação geral de transaminação. Inicialmente, o grupo amino de um aminoácido é transferido ao piridoxal fosfato, que é convertido a piridoxamina fosfato; a seguir é doado ao α-cetoglutarato, produzindo glutamato.

As aminotransferases da maioria dos tecidos de mamíferos utilizam o α-cetoglutarato como aceptor do grupo amino, formando glutamato; podem reagir, embora com afinidade menor, com oxaloacetato, que é convertido a aspartato. Por outro lado, essas enzimas aceitam diferentes aminoácidos como substratos doadores de grupo amino — o nome da aminotransferase deriva do aminoácido pelo qual a enzima tem maior afinidade. Um exemplo importante é a *alanina aminotransferase*, também conhecida por *alanina transaminase* (*ALT*) ou *transaminase glutâmico-pirúvica* (*TGP*):

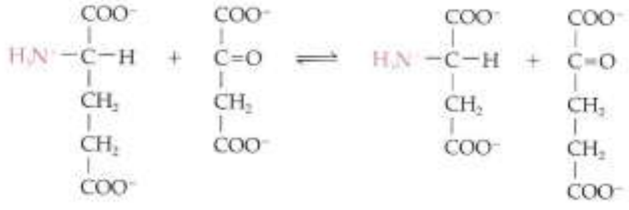
Alanina + α-Cetoglutarato ⇌ Piruvato + Glutamato

O glutamato é, portanto, um produto comum às reações de transaminação, constituindo um reservatório temporário de grupos amino, provenientes de muitos aminoácidos.

Em uma segunda etapa, os grupos amino originam aspartato e/ou amônia

O glutamato formado segue dois caminhos importantes: uma nova transaminação ou uma desaminação.

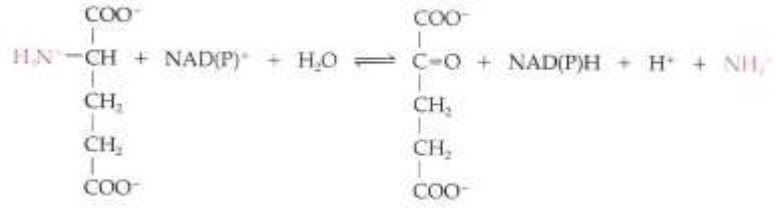
A remoção do grupo amino do próprio glutamato por transaminação é possível porque as reações catalisadas pelas aminotransferases são facilmente reversíveis, pois têm constante de equilíbrio próxima de 1. Por ação da *aspartato aminotransferase*, também chamada de *aspartato transaminase* (*AST*) ou *transaminase glutâmico-oxalacética* (*TGO*), o grupo amino do glutamato é transferido para o oxaloacetato, formando aspartato, o segundo depositário do grupo amino dos aminoácidos:



Glutamato Oxaloacetato Aspartato α-Cetoglutarato

A aspartato aminotransferase é a aminotransferase mais ativa na maioria dos tecidos de mamíferos, evidenciando a importância da transaminação entre glutamato e aspartato.

A desaminação do glutamato libera seu grupo amino como NH_3 (amônia), que se converte em NH_4^+ (íon amônio) no pH fisiológico. Esta reação é catalisada pela *glutamato desidrogenase*, uma enzima mitocondrial, encontrada principalmente no fígado, que é um exemplo raro de enzima que utiliza NAD^+ *ou* $NADP^+$ como coenzima:



Glutamato α-Cetoglutarato

A glutamato desidrogenase é específica para glutamato, e não se conhecem desidrogenases análogas para qualquer outro aminoácido. Portanto, para que o grupo amino dos aminoácidos seja liberado como NH_4^+ deve antes estar presente no glutamato.

A ação combinada das aminotransferases e da glutamato desidrogenase (Fig. 17.3) resulta na convergência do grupo amino da maioria dos aminoácidos para dois compostos únicos: NH_4^+ e aspartato.

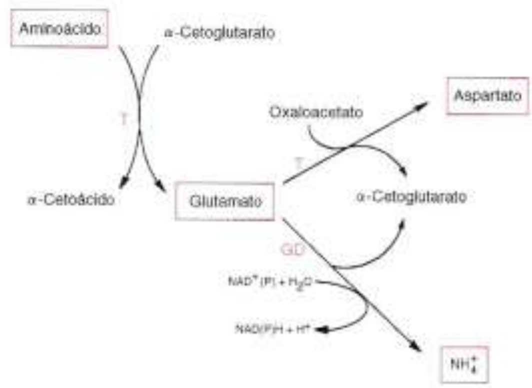


Fig. 17.3 A ação conjunta das transaminases (T) e da glutamato desidrogenase (GD) permite canalizar o nitrogênio da maioria dos aminoácidos para aspartato e NH_4^+.

Alguns aminoácidos são desaminados por reações especiais

Há nove aminoácidos — asparagina, glicina, glutamina, histidina, lisina, metionina, prolina, serina e treonina — que não participam de reações de transaminação. As vias de degradação destes aminoácidos, ao contrário dos outros onze, não se iniciam, portanto, com transaminação com α-cetoglutarato, e seu grupo amino é removido por reações particulares a cada um deles. Entretanto, um aspecto comum e importante do metabolismo destes aminoácidos é a forma de remoção do grupo amino: ao longo das vias de degradação, o grupo amino ou é liberado como NH_4^+, por reações de desaminação, ou forma glutamato por transaminação de um intermediário aminado com α-cetoglutarato. Desta forma, os átomos de nitrogênio deste conjunto de aminoácidos convergem para os mesmos produtos originados pelo grupo amino dos outros aminoácidos: NH_4^+ e glutamato, que pode originar aspartato.

Concluindo, *na degradação dos 20 aminoácidos, o grupo amino é convertido finalmente em NH_4^+ e aspartato, os precursores da uréia* (Fig. 17.4).

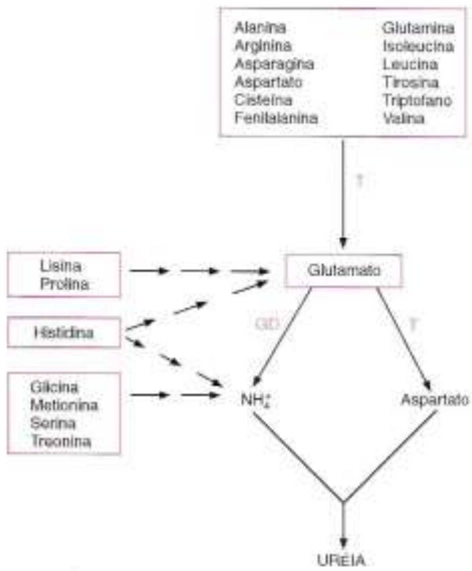


Fig. 17.4 Conversão do grupo amino dos aminoácidos em uréia: o grupo amino de 12 aminoácidos é coletado, por meio de transaminases, como glutamato. Do glutamato é convertido a NH_4^+ pela glutamato desidrogenase ou a aspartato; outros 7 aminoácidos originam NH_4^+ e glutamato por vias especiais. O esquema mostra o papel central do glutamato no caminho do nitrogênio dos aminoácidos até a uréia. T: transaminase; GD: glutamato desidrogenase.

A uréia é sintetizada a partir de NH_4^+, aspartato e CO_2

Os dois átomos de nitrogênio presentes na uréia são provenientes de NH_4^+ e aspartato, e o átomo de carbono, de CO_2 (HCO_3^-). Em mamíferos, a uréia é produzida no fígado, sendo transportada para o rim e excretada na urina.

A síntese (Fig. 17.5) inicia-se na matriz mitocondrial, com a formação de carbamoil-fosfato a partir de bicarbonato e amônio, que consome duas moléculas de ATP. As reações subseqüentes compõem o *ciclo da uréia* ou *ciclo de Krebs-Henseleit*. O carbamoil-fosfato, ainda na mitocôndria, condensa-se com ornitina, originando citrulina; a citrulina é transportada para o citossol, onde reage com aspartato, formando arginino-succinato; este se decompõe em arginina e fumarato; a arginina é hidrolisada, produzindo uréia e regenerando ornitina, que retorna à mitocôndria. A analogia do ciclo da uréia com o ciclo de Krebs é evidente: a ornitina tem papel semelhante ao do oxaloacetato e o carbamoil-fosfato equivale à acetil-CoA.

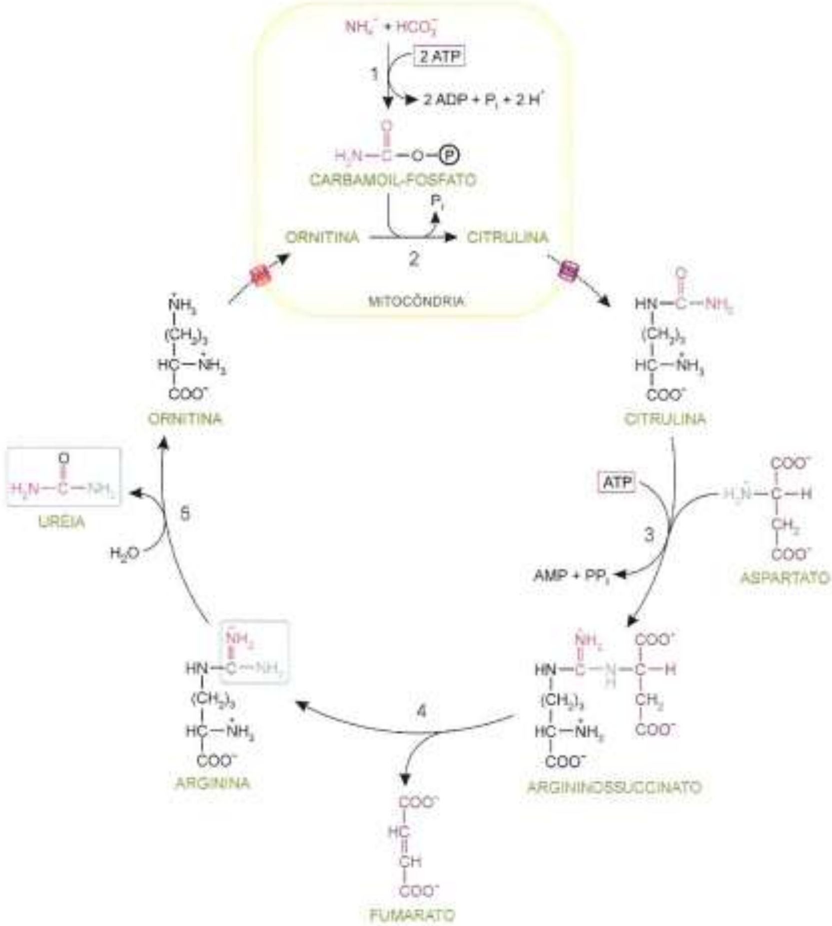


Fig. 17.5 Ciclo da uréia — as enzimas envolvidas são: (1) carbamoil-fosfato sintetase, (2) ornitina transcarbamoilase, (3) argininossuccinato sintetase, (4) argininossuccinato liase e (5) arginase. As duas primeiras enzimas são mitocondriais, e as restantes, citoplasmáticas. A migração de ornitina e citrulina entre estes compartimentos é mediada por translocases específicas (indicadas nas setas tracejadas). A enzima 1, a rigor, não faz parte do ciclo da uréia.

A soma da reação de produção de carbamoil-fosfato com as reações do ciclo da uréia mostra a equação geral da síntese de uréia a partir de NH_4^+, aspartato e HCO_3^-:

$$\text{Aspartato} + NH_4^+ + HCO_3^- + 3\,ATP + H_2O \longrightarrow \text{Uréia} + \text{Fumarato} + 2\,ADP + 2P_i + AMP + PP_i + 4H^+$$

A síntese de uma molécula de uréia consome, portanto, quatro ligações fosfato ricas em energia, uma vez que o pirofosfato é prontamente hidrolisado. Todavia, o aspartato consumido no ciclo da uréia pode ser regenerado pelo fumarato formado nesta via. O fumarato pode ser convertido a oxaloacetato, por reações idênticas às do ciclo de Krebs, catalisadas, entretanto, por isoenzimas citossólicas. O oxaloacetato, por transaminação, forma aspartato (Fig. 17.6). Este acoplamento inclui a produção de 1 NADH, na reação da malato desidrogenase, a partir do qual são sintetizados 3 ATP na fosforilação oxidativa. Assim, no cômputo geral há gasto de apenas uma ligação rica em energia para a síntese de uréia. ***A regulação do ciclo da uréia está descrita no Capítulo 20.***

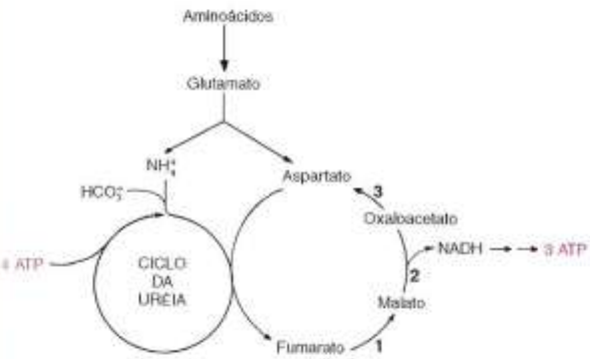


Fig. 17.6 Esquema geral da síntese de uréia, mostrando o balanço energético do processo. A regeneração do aspartato a partir de fumarato formado no ciclo da uréia envolve a participação das seguintes enzimas citossólicas: (1) fumarase, (2) malato desidrogenase e (3) transaminase; forma-se um NADH que produz 3 ATP pela fosforilação oxidativa, reduzindo a energia consumida na síntese da uréia.

A uréia é o principal produto de excreção do metabolismo nitrogenado de mamíferos terrestres; aves e répteis excretam ácido úrico, e peixes, amônia. A quantidade de uréia excretada por um ser humano adulto com dieta equilibrada é cerca de 30 g por dia. Este valor aumenta proporcionalmente ao aumento da quantidade de proteína ingerida, já que não há reserva de aminoácidos e todo o nitrogênio excedente será transformado em uréia.

Nos seres humanos, 90% do nitrogênio urinário está sob a forma de uréia. O restante (Tabela 17.2) aparece sob a forma de creatinina (resultante da degradação de creatina), urato (proveniente da degradação de purinas) e íon amônio. Apesar de NH_4^+ representar uma pequena porcentagem do nitrogênio urinário, sua excreção equivale à eliminação de H^+, contribuindo de maneira decisiva para a manutenção do pH plasmático. A produção de amônia e sua excreção como NH_4^+ na urina possibilita a eliminação de ácidos fortes, como o ácido sulfúrico gerado no catabolismo de cisteína e metionina ou de cetoácidos, cuja concentração aumenta muito na acidose metabólica. Assim, o conteúdo de NH_4^+ da urina aumenta na acidose e diminui na alcalose.

Tabela 17.2 Compostos nitrogenados excretados por um homem adulto

Composto	Quantidade excretada (g/dia)
Uréia	30
NH_4^+	0,7
Creatinina	1,4
Ácido úrico	0,8

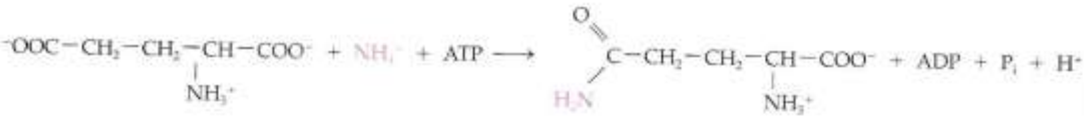
A amônia é tóxica para os tecidos animais, especialmente para o cérebro

A conversão da maior parte do NH_4^+ em uréia é fundamental para manter baixas as concentrações deste íon no sangue e nos tecidos. Quando há restrição na formação de uréia por insuficiência hepática grave, causada por hepatite ou cirrose, por exemplo, a concentração plasmática de NH_4^+ se eleva (*hiperamonemia*) ocasionando uma encefalopatia que pode resultar em coma, e morte. O mecanismo preciso da encefalopatia é obscuro. Postula-se que altos níveis de NH_4^+ poderiam levar a grande consumo de α-cetoglutarato para a síntese de glutamato, na reação catalisada pela glutamato desidrogenase; haveria uma depleção de intermediários do ciclo de Krebs com redução da velocidade de oxidação da glicose, a principal fonte de ATP para o cérebro. A hiperamonemia comprometeria ainda a transmissão do impulso nervoso: o número de receptores para o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, o ácido γ-aminobutírico (GABA), sintetizado a partir de glutamato, aumentaria, resultando em atividade neural diminuída e encefalopatia.

Glutamina e alanina são os transportadores de amônia para o fígado

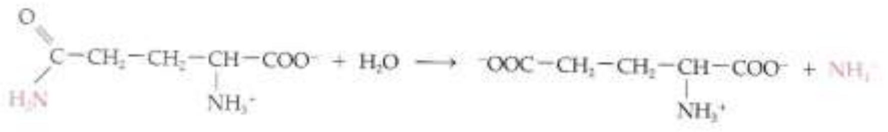
Devido à sua toxidez e por ser convertido em uréia no fígado, o NH_4^+ produzido nos outros tecidos deve ser incorporado em compostos não-tóxicos e que atravessem membranas com facilidade, sendo assim levado àquele órgão — estes compostos são os próprios aminoácidos. De fato, as principais formas de transporte são glutamina e alanina.

A glutamina é sintetizada a partir de NH_4^+, glutamato e ATP, numa reação catalisada pela *glutamina sintetase*:



Glutamato Glutamina

Uma vez no fígado, o grupo amida da glutamina é hidrolisado pela *glutaminase*, liberando NH_4^+, que pode ser consumido pelo ciclo da uréia.



Glutamina Glutamato

O rim também expressa glutaminase — a presença desta enzima permite a produção da amônia urinária, desempenhando um papel fundamental no equilíbrio ácido-base.

No caso do transporte como alanina, o grupo amino dos aminoácidos é doado para piruvato por transaminação. A alanina, no fígado, é convertida em glutamato. O glutamato pode originar os dois átomos de nitrogênio da uréia (Fig. 17.4).

17.2.2 DEGRADAÇÃO DA CADEIA CARBÔNICA DOS AMINOÁCIDOS

A cadeia carbônica dos aminoácidos é degradada a piruvato, acetil-CoA ou intermediários do ciclo de Krebs

Removido o grupo amino do aminoácido, resta sua cadeia carbônica, na forma de α-cetoácido. As vinte cadeias carbônicas diferentes são oxidadas por vias próprias que, todavia, convergem para a produção de apenas alguns compostos: *piruvato, acetil-CoA* ou *intermediários do ciclo de Krebs (oxaloacetato, α-cetoglutarato, succinil-CoA* e *fumarato*). A partir deste ponto, o metabolismo da cadeia carbônica dos aminoácidos confunde-se com o das cadeias carbônicas de carboidratos ou de ácidos graxos.

O destino final dos α-cetoácidos, que dependerá do tecido e do estado fisiológico considerados, poderá ser: oxidação pelo ciclo de Krebs, fornecendo energia; utilização pela gliconeogênese, para a produção de glicose, e conversão a triacilgliceróis e armazenamento.

A maioria dos aminoácidos produz piruvato ou intermediários do ciclo de Krebs, precursores da gliconeogênese, e são, por isto, chamados *glicogênicos*. A leucina origina corpos cetônicos, sendo o único aminoácido exclusivamente *cetogênico*. Alguns outros aminoácidos — isoleucina, fenilalanina, tirosina, treonina e triptofano — têm parte de sua cadeia carbônica convertida em acetoacetato ou acetil-CoA e parte convertida a intermediários do ciclo de Krebs. São tanto glicogênicos quanto cetogênicos, isto é, são *glicocetogênicos*.

Para sistematizar o estudo de sua degradação, os aminoácidos serão reunidos em seis grupos (Fig. 17.7), segundo o principal produto formado:

1. piruvato	4. succinil-CoA
2. oxaloacetato	5. α-cetoglutarato
3. fumarato	6. acetil-CoA

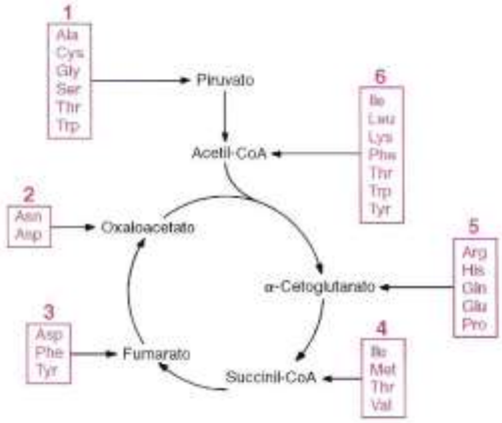


Fig. 17.7 Destino da cadeia carbônica dos aminoácidos, que foram reunidos em seis grupos (1 a 6), de acordo com o composto formado.

Alguns aminoácidos estão incluídos em mais de um grupo ou porque apresentam vias de degradação alternativas, ou porque seu esqueleto de carbono divide-se, originando compostos diferentes. A descrição de cada grupo é precedida de seu esquema geral, mostrando o destino dos carbonos dos aminoácidos que o compõem, como, por exemplo, a Fig. 17.8, referente ao Grupo 1.

Grupo 1. Aminoácidos que são convertidos a piruvato (Fig. 17.8): Ala, Cys, Gly, Ser, Thr, Trp

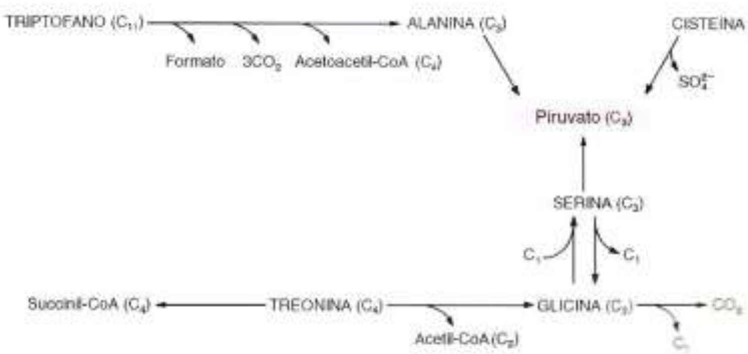


Fig. 17.8 Esquema da degradação do Grupo 1 de aminoácidos, convergindo para a produção de piruvato. C_1 representa a unidade de um carbono incorporado a FH_4 (tetraidrofolato).

Alanina. Forma diretamente piruvato por transaminação com α-cetoglutarato, catalisada pela alanina transaminase.

Cisteína. Há duas vias que a convertem a piruvato (Fig. 17.9). O átomo de enxofre, nos seres humanos, é excretado principalmente na forma de sulfato. O sulfato resulta da oxidação de sulfito, a etapa final da degradação dos aminoácidos que contêm enxofre, cisteína e metionina. A reação é catalisada pela *sulfito oxidase*, uma enzima presente no espaço intermembranas da mitocôndria, que contém molibdênio e um grupo heme. A hidroxilação oxidativa do sulfito envolve transferências intramoleculares de elétrons para o ferro hêmico e sua reoxidação por citocromo *c*. A deficiência genética de sulfito oxidase acarreta distúrbios neurológicos severos e, geralmente, ocasiona morte nos dois primeiros anos de vida.

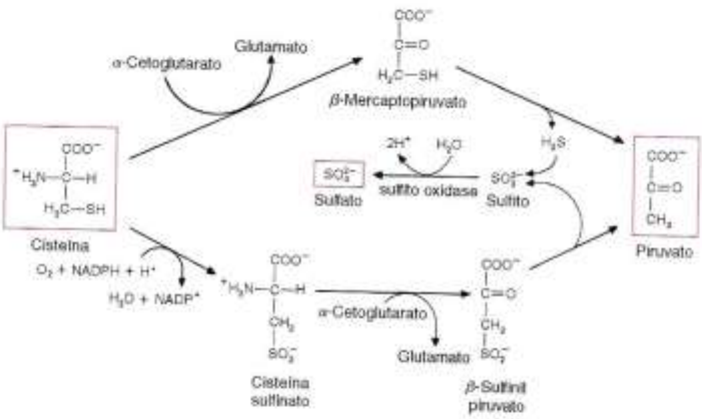


Fig. 17.9 A cisteína é convertida a piruvato por duas vias, com produção de sulfato.

Glicina. Além de formar serina, pode ser oxidada a CO_2, NH_4^+ e um radical monocarbônico (C_1), que é transferido ao *tetraidrofolato* (FH_4). O tetraidrofolato é uma coenzima transportadora de unidades monocarbônicas que apresenta, em sua estrutura, uma vitamina: o *ácido fólico*. O FH_4 é uma coenzima característica do metabolismo de aminoácidos e de nucleotídios. A glicina pode, ainda, ser desaminada oxidativamente a glioxilato (Fig. 17.10). Nas *hiperoxalúrias*, doenças hereditárias raras, o glioxilato é oxidado a oxalato, que se acumula nos tecidos sob a forma de oxalato de cálcio. A ingestão de grandes quantidades de *ascorbato (vitamina C)* pode também ocasionar a formação de cálculos de oxalato de cálcio.

Serina. Origina piruvato por desaminação, precedida por desidratação, catalisada pela *serina desidratase* (Fig. 17.10), ou glicina, graças à transferência do radical metileno (C_1) ao FH_4 promovida pela *serina hidroximetil transferase*:

$$\text{Serina} + FH_4 \rightleftharpoons \text{Metileno-}FH_4 + \text{Glicina}$$

Nas duas reações, há participação de piridoxal-fosfato.

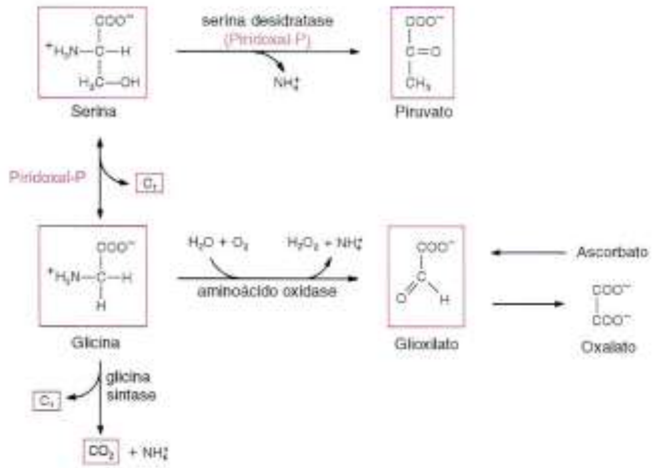


Fig. 17.10 Vias de degradação de serina e glicina. C_1 representa um carbono ligado a FH_4.

Treonina. Em uma das vias de degradação possíveis, o carbono α é oxidado e a cadeia carbônica é cindida, produzindo glicina e acetaldeído; o acetaldeído gera acetil-CoA (Fig. 17.11). A outra via de degradação inicia-se, como no caso da serina, com a remoção do grupo amino pela treonina desidratase, que também utiliza piridoxal-fosfato, e origina succinil-CoA (Grupo 4).

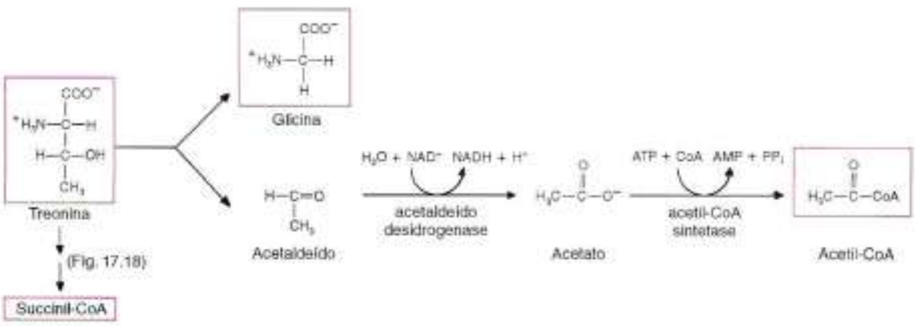


Fig. 17.11 Uma das vias de degradação de treonina, que produz glicina e acetil-CoA; a outra, que produz succinil-CoA, está mostrada na Fig. 17.18.

Triptofano. Na sua degradação, três carbonos são transformados em alanina, um em formato e quatro em acetoacetil-CoA (Grupo 6).

Grupo 2. Aminoácidos que são convertidos a oxaloacetato (Fig. 17.12): Asn, Asp

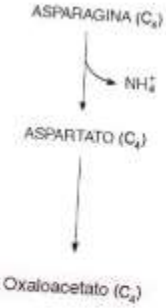


Fig. 17.12 Esquema da conversão do Grupo 2 de aminoácidos a oxaloacetato.

Asparagina. Por hidrólise, forma aspartato e NH_4^+ (Fig. 17.13).

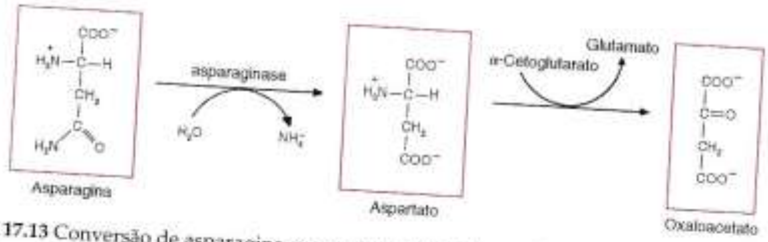


Fig. 17.13 Conversão de asparagina a aspartato, que produz oxaloacetato por transaminação.

Aspartato. Convertido a oxaloacetato por ação da aspartato transaminase (Fig. 17.13); forma também fumarato (Grupo 3).

Grupo 3. Aminoácidos que são convertidos a fumarato (Fig. 17.14): Asp, Phe, Tyr

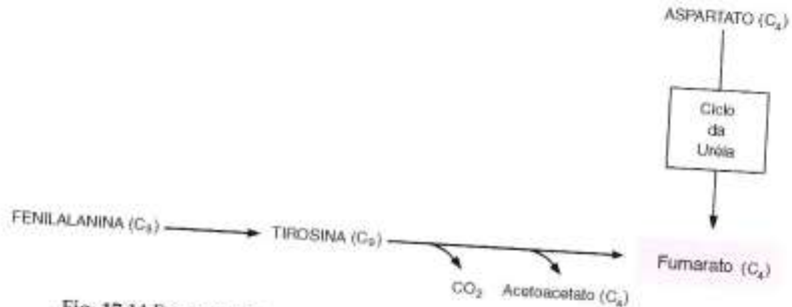


Fig. 17.14 Esquema da conversão do Grupo 3 de aminoácidos a fumarato.

Aspartato. É um dos substratos do ciclo da uréia, onde é convertido a fumarato (Fig. 17.5).

Fenilalanina. Produz tirosina por uma oxidação irreversível, detalhada à Seção 17.3, catalisada por *fenilalanina hidroxilase* (Fig. 17.15), uma monoxigenase. As *monoxigenases* incorporam um átomo de oxigênio no substrato (como hidroxila) e o outro em H_2O, com a oxidação concomitante de NADPH. As *dioxigenases*, por sua vez, incorporam os dois átomos de oxigênio no substrato, promovendo a cisão de anéis aromáticos em geral (ver Grupo 6).

Tirosina. Os nove carbonos da tirosina aparecem como fumarato, acetoacetato e CO_2 (Fig. 17.15).

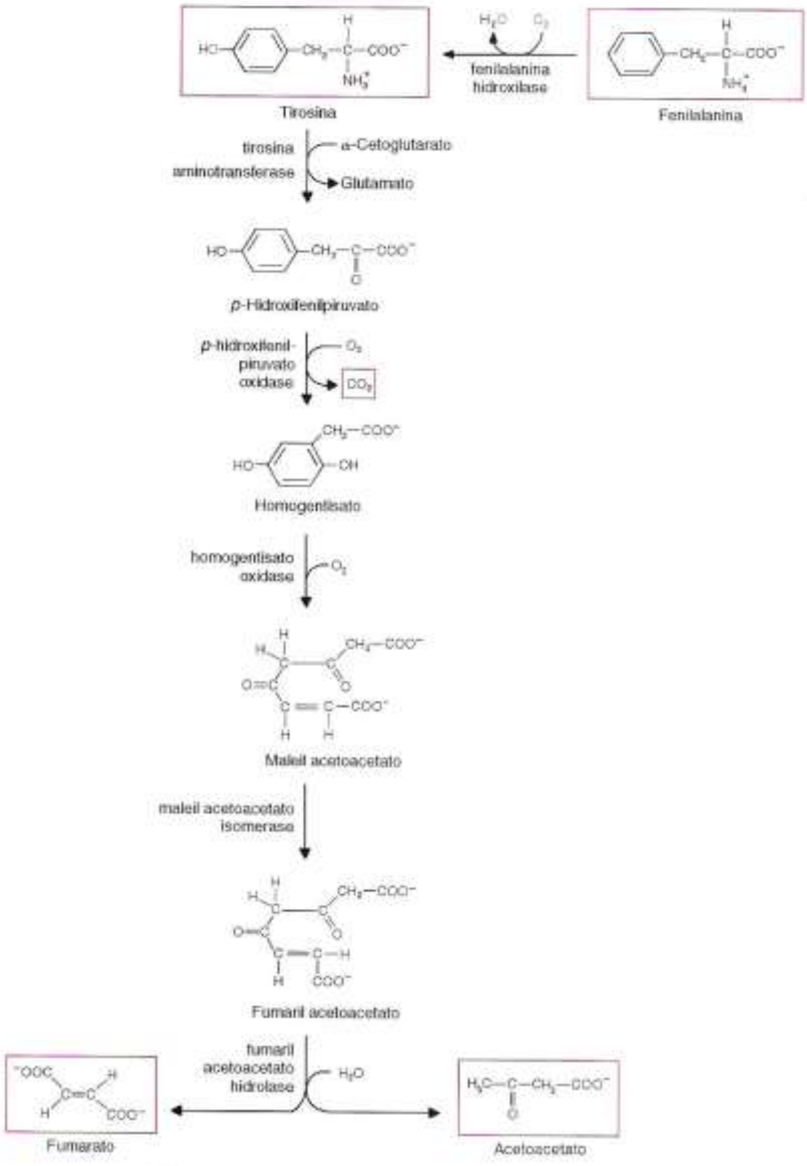


Fig. 17.15 Via de degradação de fenilalanina e tirosina.

Grupo 4. Aminoácidos que são convertidos a succinil-CoA (Fig. 17.16): Ile, Val, Met e Thr

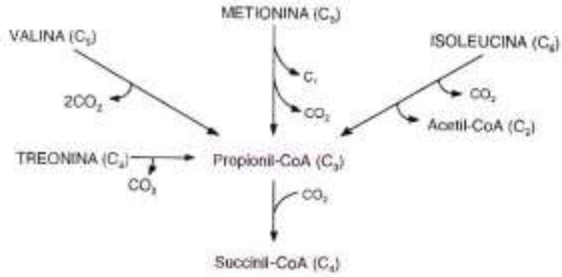


Fig. 17.16 Esquema da conversão do Grupo 4 de aminoácidos a succinil-CoA.

Os aminoácidos que produzem succinil-CoA são inicialmente transformados em propionil-CoA, que também é produzida na oxidação de ácidos graxos com número ímpar de carbonos. Fazem parte deste grupo dois aminoácidos (isoleucina e valina) que, conjuntamente com a leucina, são chamados de *aminoácidos ramificados*, devido à estrutura de suas cadeias laterais. Enquanto *isoleucina* e *valina* formam succinil-CoA, *leucina* forma acetoacetato e acetil-CoA (ver Grupo 6). Apesar de o catabolismo dos três aminoácidos resultar em compostos diferentes, ele inicia-se com uma reação de transaminação catalisada por uma única enzima, formando os respectivos α-cetoácidos ramificados. Estes são descarboxilados oxidativamente por um complexo enzimático semelhante à piruvato desidrogenase, a *desidrogenase de α-cetoácidos ramificados*, que utiliza como coenzimas: tiamina pirofosfato, ácido lipóico, CoA, NAD e FAD. Resultam as respectivas acil-CoA ramificadas com um carbono a menos. O catabolismo de aminoácidos ramificados em músculos esqueléticos tem grande importância no jejum.

Isoleucina e Valina. As acil-CoA derivadas de valina e isoleucina são oxidadas por reações semelhantes às da β-oxidação, que convertem valina a propionil-CoA e isoleucina a propionil-CoA e acetil-CoA (Fig. 17.17).

Metionina. Forma α-cetobutirato, que é oxidado a propionil-CoA, por um sistema semelhante à piruvato desidrogenase; nesta via, forma-se *S-adenosilmetionina*, que atua como doador de radicais *metil* para a síntese de compostos importantes, por exemplo, epinefrina. O átomo de enxofre é doado para a serina, formando cisteína, o outro único aminoácido que contém enxofre (Fig. 17.18).

Treonina. Por desaminação catalisada pela treonina desidratase, produz também α-cetobutirato como a metionina (Fig. 17.18).

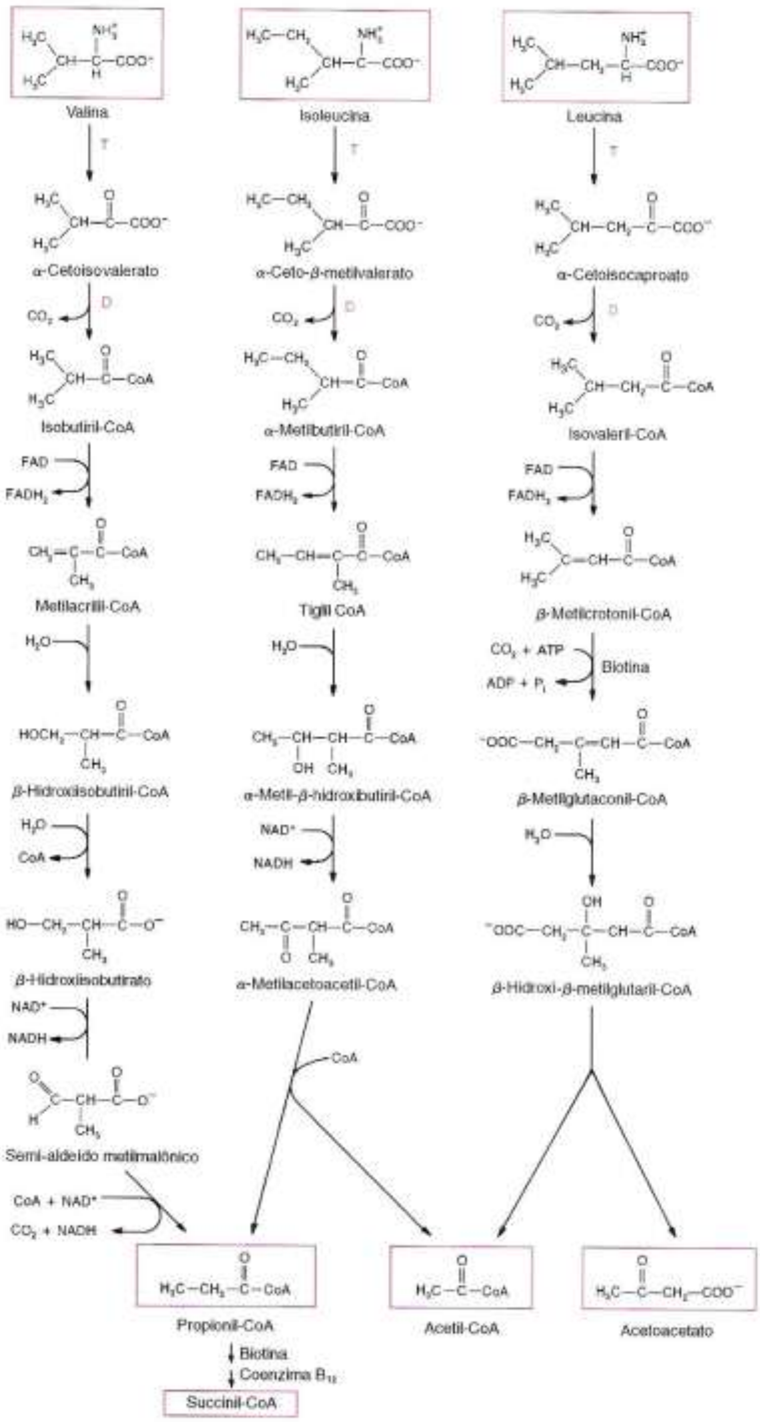


Fig. 17.17 Vias de degradação dos aminoácidos ramificados: valina, isoleucina e leucina. As respectivas acil-CoA ramificadas são produzidas por ação de duas enzimas: a transaminase de aminoácidos ramificados (**T**) e a desidrogenase de α-cetoácidos ramificados (**D**).

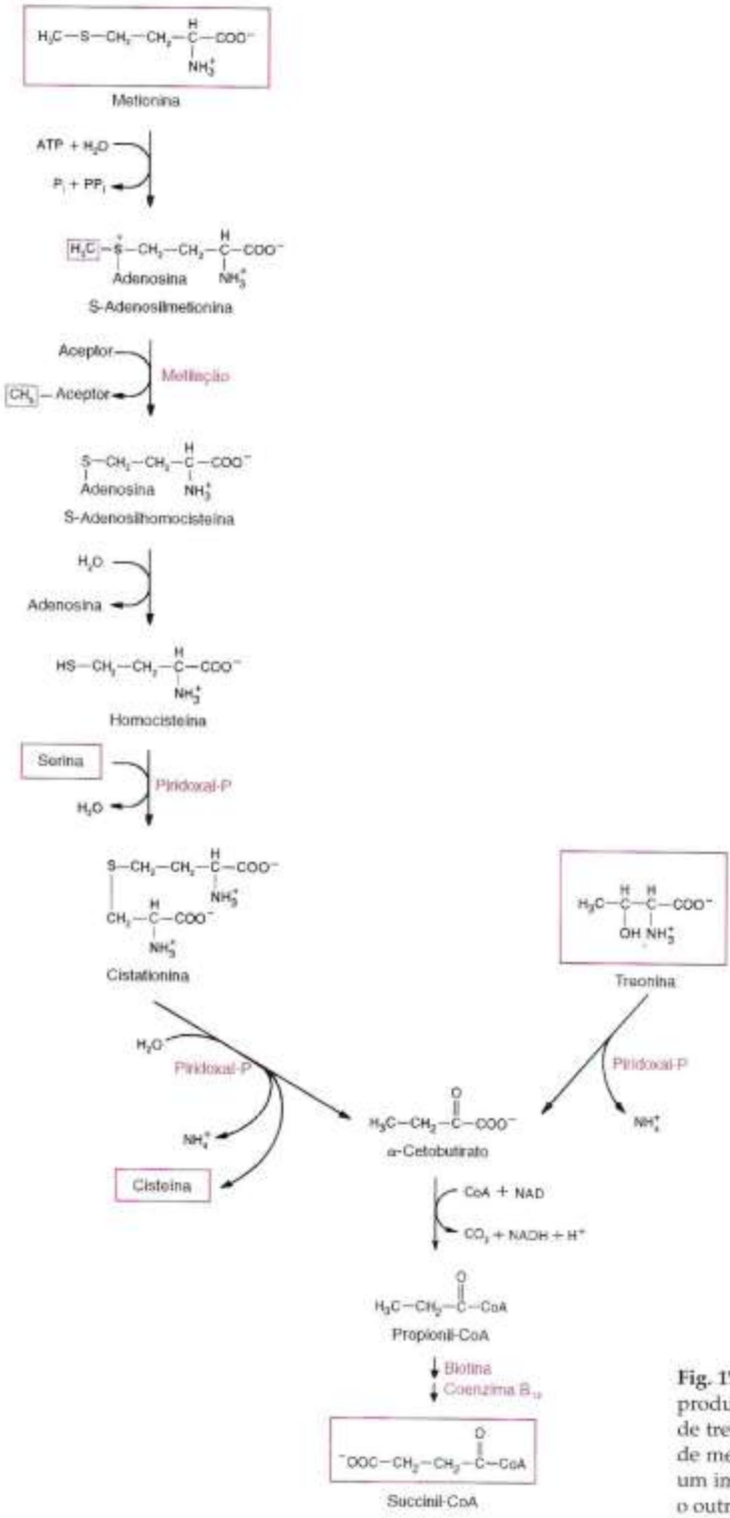


Fig. 17.18 Vias de degradação da metionina e treonina, produzindo succinil-CoA. A outra via de degradação de treonina está mostrada na Fig. 17.11. A degradação de metionina inclui a síntese de S-adenosilmetionina, um importante doador de radicais metil, e de cisteína, o outro aminoácido que contém enxofre.

Grupo 5. Aminoácidos que são convertidos a α-cetoglutarato (Fig. 17.19): Glu, Gln, Pro, Arg, His

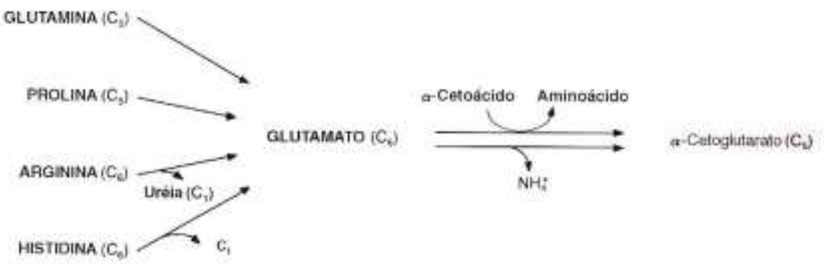


Fig. 17.19 Esquema da conversão do Grupo 5 de aminoácidos a α-cetoglutarato, via glutamato. C_1 = unidade monocarbônica transferida a FH_4.

Os aminoácidos deste grupo originam α-cetoglutarato por prévia conversão a glutamato (Fig. 17.20).

Glutamato. Converte-se em α-cetoglutarato por transaminação ou por desaminação oxidativa catalisada pela glutamato desidrogenase.

Glutamina. O grupo amino é liberado por ação da glutaminase, formando glutamato.

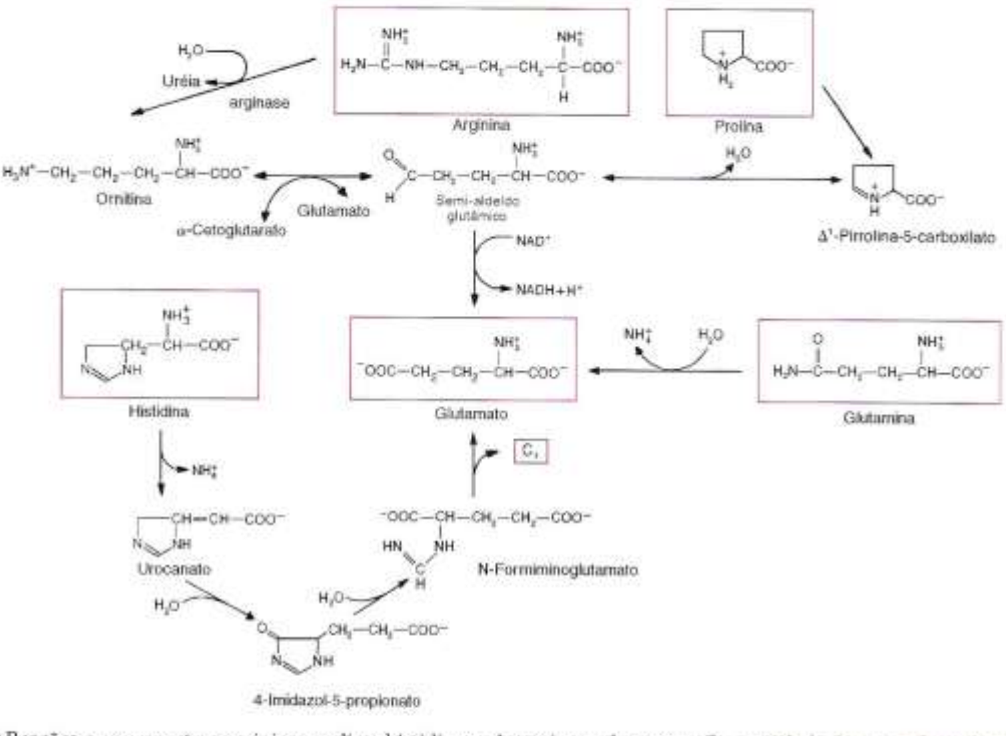


Fig. 17.20 Reações que convertem arginina, prolina, histidina e glutamina a glutamato. C_1 = unidade de um carbono ligada a FH_4.

Prolina. Todos os átomos de carbono da prolina aparecem como glutamato.

Arginina. Ao ser hidrolisada pela arginase no ciclo da uréia, um dos carbonos aparece na uréia e os outros passam a constituir ornitina, que origina glutamato.

As vias de degradação de prolina e arginina convergem para um intermediário comum, o semi-aldeído glutâmico, que é oxidado a glutamato.

Histidina. Cinco carbonos produzem glutamato e um carbono é transferido ao tetraidrofolato.

Grupo 6. Aminoácidos que são convertidos a acetil-CoA (Fig. 17.21): Phe, Tyr, Trp, Lys, Ile, Thr, Leu

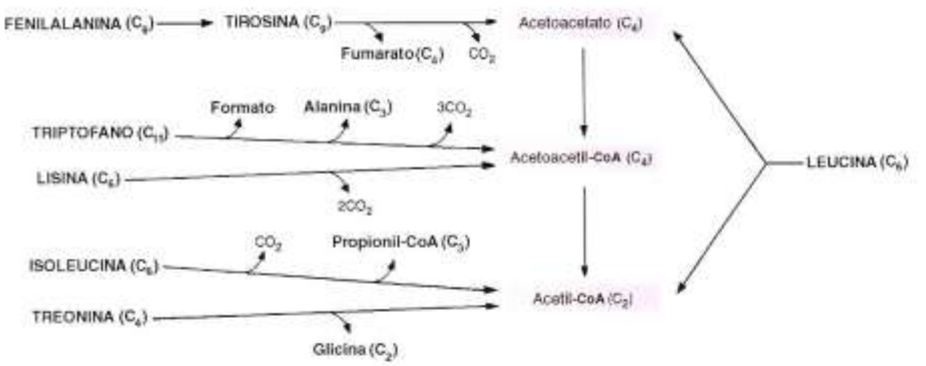


Fig. 17.21 Esquema geral da degradação do Grupo 6 de aminoácidos a acetil-CoA.

A formação de acetil-CoA pode ser direta ou indireta (via acetoacetato ou acetoacetil-CoA). Alguns dos aminoácidos que produzem acetil-CoA — fenilalanina, tirosina, triptofano, isoleucina e treonina — produzem também compostos precursores de glicose: são os aminoácidos *glicocetogênicos*. Assim, quatro dos carbonos de fenilalanina e tirosina são convertidos a fumarato (Grupo 3), três do triptofano a alanina e três da isoleucina a propionil-CoA (Grupo 4); a treonina, por uma via alternativa, converte-se a succinil-CoA (Grupo 4). Segue-se a descrição da oxidação de triptofano, lisina e leucina.

Triptofano. Produz acetoacetil-CoA por uma via (Fig. 17.22) que inclui três reações com oxigênio: duas são catalisadas por *dioxigenases* e uma por *monoxigenase* (*hidroxilase*). Um dos intermediários da via de degradação do triptofano é precursor de *ácido nicotínico* (*vitamina* B_5); esta síntese supre parte da necessidade desta vitamina.

Lisina. Forma acetoacetil-CoA via 2-cetodipato, como o triptofano. A lisina tem um grupo ε-amino que não pode ser removido por transaminação. A via de degradação predominante em mamíferos inicia-se com ligação do grupo ε-amino a α-cetoglutarato, formando um composto de adição, a sacaropina. Esta é clivada, liberando glutamato e 2-aminoadipato, que, após transaminação, origina 2-cetoadipato (Fig. 17.22). Como os átomos de carbono da lisina originam acetoacetil-CoA (ou CO_2), esperar-se-ia que ela fosse um aminoácido cetogênico; todavia, quando administrada a animais de laboratório, verifica-se que não há excreção aumentada de corpos cetônicos.

Leucina. Sua via de degradação tem passos iniciais comuns à dos outros aminoácidos ramificados, valina e isoleucina (ver Grupo 4 e Fig. 17.17), mas os produtos finais são exclusivamente acetoacetato e acetil-CoA. A acil-CoA formada a partir de leucina é transformada, por reações que incluem carboxilação por *biotina*, em *3-hidroxi 3-metilglutaril-CoA*. Este composto, que participa das vias de síntese de corpos cetônicos e de colesterol, é clivado a acetil-CoA e acetoacetato. Deste modo, a leucina é o único aminoácido exclusivamente *cetogênico*.

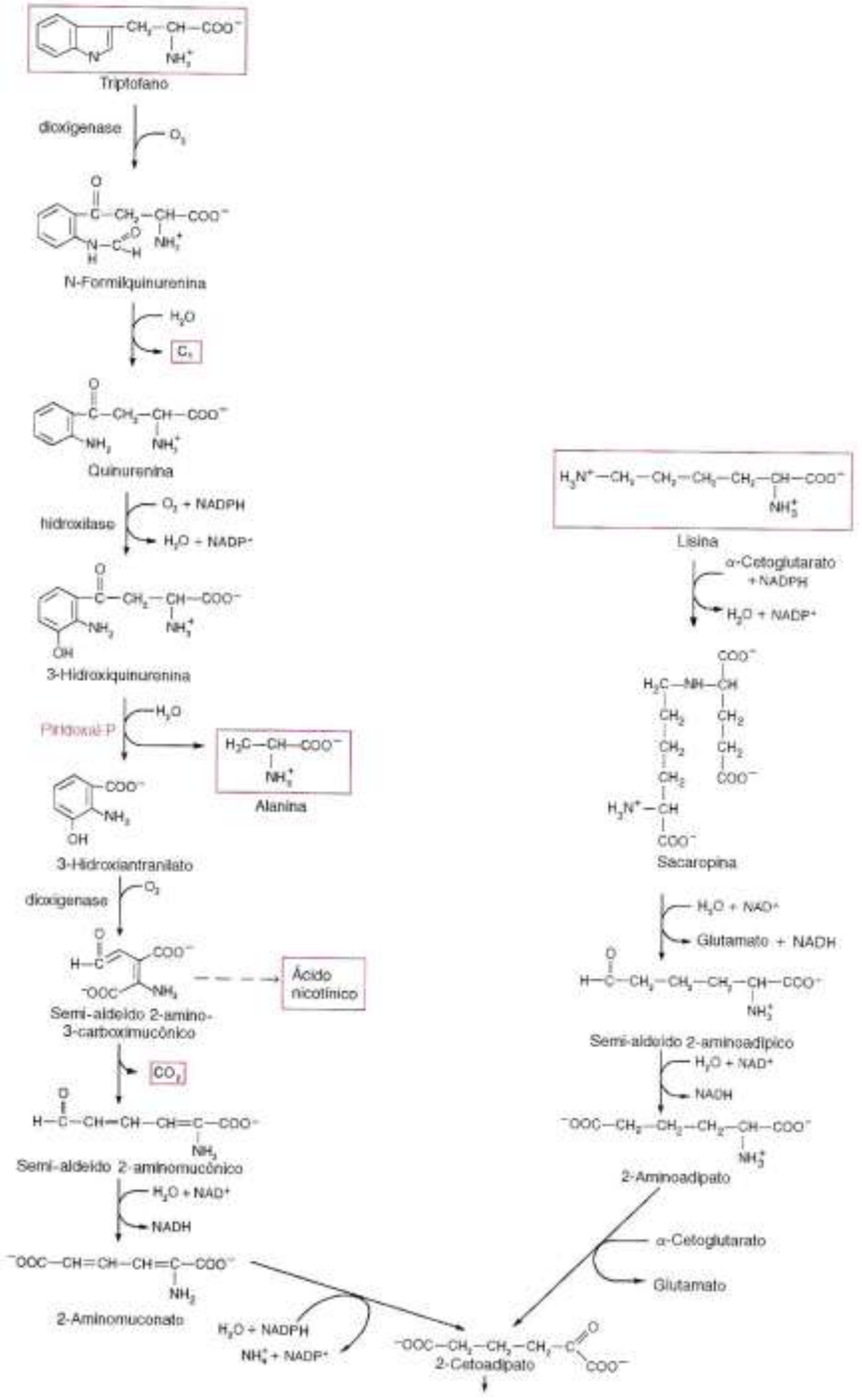


Fig. 17.22 Conversão de triptofano e lisina a acetoacetil-CoA, envolvendo um intermediário comum: o 2-cetoadipato. *(continua)*

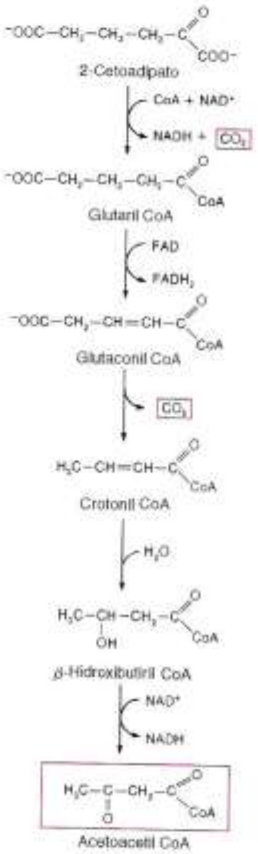


Fig. 17.22 Continuação.

17.3 DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Um grande número de doenças hereditárias resultantes de defeitos enzimáticos foi descrito nos seres humanos. Estas doenças são geralmente raras e transmitidas por genes autossômicos recessivos. Em indivíduos homozigotos, a atividade enzimática pode apresentar-se alterada (K_M ou $V_{máx}$ modificados) ou estar ausente; os heterozigotos não manifestam a doença, pois um alelo normal determina síntese suficiente de enzima.

As doenças hereditárias do metabolismo de aminoácidos (são conhecidas mais de 100) constituem a maioria das doenças genéticas metabólicas, resultado do grande número de enzimas que participam das muitas vias que compõem essa área do metabolismo.

A conseqüência direta da deficiência enzimática é o acúmulo de um metabólito em todos os fluidos corpóreos e a sua excreção na urina. O diagnóstico é feito por dosagem, no sangue ou na urina, do metabólito acumulado ou, alternativamente, por dosagem da enzima no sangue, hemácias ou leucócitos. Em alguns casos, só é possível dosar a enzima a partir de um grande número de células, que devem ser obtidas de culturas *in vitro*. Para o diagnóstico pré-natal, utilizam-se culturas de células coletadas do líquido amniótico. A dosagem da enzima permite ainda identificar portadores da moléstia, pois estes apresentam concentração de enzima menor do que a de indivíduos normais.

A alteração da via metabólica que inclui a enzima afetada tem amplos reflexos sobre outras vias. Os efeitos globais da deficiência enzimática variam de acordo com a enzima defeituosa, podendo ser tão graves que inviabilizam o feto; mais freqüentemente, provocam lesões a partir dos primeiros meses de vida, determinando retardamento mental e físico e expectativa de vida reduzida. O diagnóstico precoce — logo após o nascimento, ou

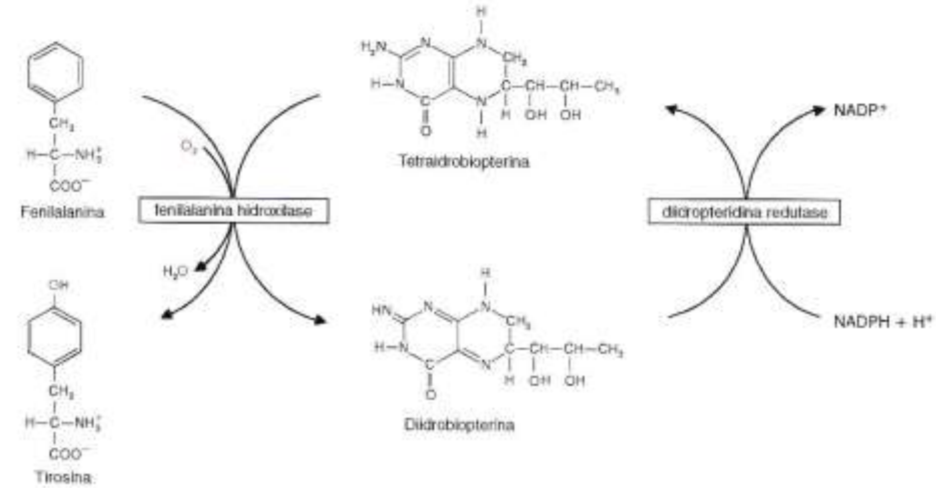


Fig. 17.23 Reação da fenilalanina hidroxilase, que converte fenilalanina em tirosina, com oxidação de tetraidrobiopterina. A tetraidrobiopterina é regenerada à custa de NADPH, por ação da diidropteridina redutase.

ainda melhor, pré-natal — é fundamental porque a forma de suprimir ou atenuar os efeitos da moléstia é reduzir a ingestão do aminoácido ao nível mínimo compatível com um crescimento normal. A partir de 1990, muitas tentativas têm sido feitas para corrigir alguns defeitos genéticos por meio de terapia gênica. Um dos protocolos utilizados consiste, basicamente, em substituir o gene mutado de linfócitos cultivados *in vitro* por genes normais utilizando técnicas de engenharia genética e introduzir as células modificadas no sistema circulatório dos indivíduos afetados.

O defeito hereditário mais freqüente do metabolismo de aminoácidos, com incidência de 1 para cada 12.000 nascimentos, é a *fenilcetonúria*, causada por ausência de *fenilalanina hidroxilase*, ou, mais raramente, de *diidropteridina redutase* (Fig. 17.23). A fenilalanina hidroxilase converte fenilalanina em tirosina e utiliza *tetraidrobiopterina* como coenzima. O evento primário da moléstia é o acúmulo de fenilalanina, que é então utilizada por vias pouco significativas em indivíduos normais, como, por exemplo, a transaminação com α-cetoglutarato, originando *fenilpiruvato* (Fig. 17.24). Um dos efeitos do fenilpiruvato é competir com o piruvato pela piruvato translocase, que promove a entrada de piruvato na mitocôndria, restringindo a produção de ATP a partir de glicose, o único substrato oxidável para o cérebro. Nos

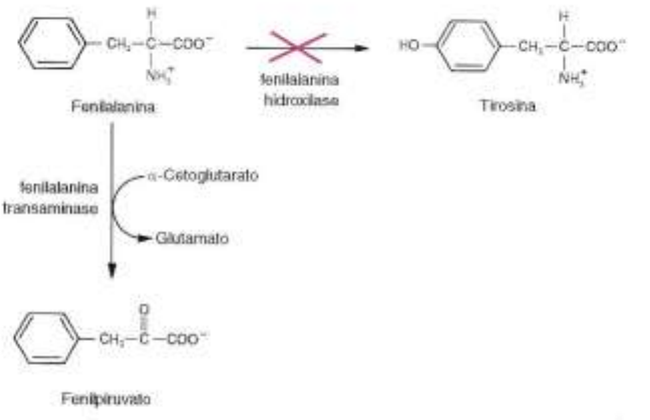
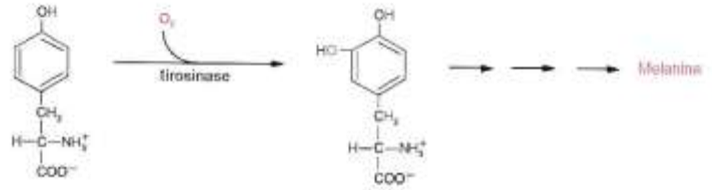


Fig. 17.24 Na fenilcetonúria, a fenilalanina não pode ser convertida em tirosina e origina fenilpiruvato.

indivíduos afetados, grandes quantidades de fenilpiruvato, e de outros compostos dele derivados, são excretadas na urina. O diagnóstico em recém-nascidos é feito pela determinação da concentração de fenilalanina no sangue, o chamado "teste do pezinho", que utiliza amostras da ordem de microlitros e constitui um critério de diagnóstico confiável. O diagnóstico pré-natal também pode ser feito com sondas de DNA, disponíveis após a clonagem do gene da fenilalanina hidroxilase.

A avaliação do nível plasmático de fenilalanina em recém-nascidos é um procedimento de rotina em muitos países, inclusive no Brasil. Esta conduta é de vital importância, já que o tratamento da fenilcetonúria consiste em administrar, precocemente, uma dieta contendo um mínimo de fenilalanina; por isso, produtos industrializados contendo fenilalanina — o adoçante aspartame, por exemplo — não devem ser consumidos por fenilcetonúricos. Estes indivíduos podem passar a ingerir fenilalanina em torno dos sete anos de idade, quando não há mais risco de injúria ao sistema nervoso central. Os indivíduos afetados apresentam, além de retardamento mental, pigmentação deficiente de pele e cabelo, devido à síntese inadequada de melanina. A fenilcetonúria foi a primeira doença genética metabólica a ser associada com um defeito enzimático específico, o que ocorreu no final da década de 1940; os mecanismos que determinam o retardamento mental não são ainda conhecidos.

O *albinismo* é devido à incapacidade de sintetizar *melanina* e caracteriza-se por pigmentação deficiente da pele, cabelo e olhos. A síntese de melanina (Fig. 17.25) inicia-se com a oxidação de tirosina a *3,4-diidroxifenilalanina* (DOPA), catalisada pela *tirosinase*, que contém cobre. Esta é a enzima ausente no tipo clássico de albinismo; nos fenilcetonúricos ela sofre inibição parcial por fenilalanina, ocasionando menor produção de melanina. DOPA é também precursora de neurotransmissores e hormônios, como dopamina, norepinefrina e epinefrina; neste caso, porém, uma outra enzima promove a conversão de tirosina a DOPA, a *tirosina hidroxilase*, análoga à fenilalanina hidroxilase e que também utiliza tetraidrobiopterina.



Tirosina

3,4-Diidroxifenilalanina (DOPA)

Fig. 17.25 Conversão de tirosina a 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA), catalisada por tirosinase. DOPA é transformada em melanina por uma série de reações complexas.

Na *moléstia da urina em xarope de bordo* (*maple syrup urine disease*), a deficiência da enzima responsável pela descarboxilação oxidativa dos aminoácidos ramificados — isoleucina, leucina e valina (Fig. 17.17) — resulta em acúmulo desses aminoácidos e de seus cetoácidos, que conferem à urina um odor semelhante ao do xarope de bordo.

A *acidemia isovalérica* caracteriza-se por um excesso de ácido valérico nos fluidos corpóreos, devido à ausência da *isovaleril-CoA desidrogenase*, que participa apenas do metabolismo da leucina (Fig. 17.17).

Com relação ao ciclo da uréia, já foram descritos defeitos hereditários causados por bloqueio parcial de cada uma das reações do ciclo (Fig. 17.26). A conseqüência é sempre uma hiperamonemia, que pode levar a coma e morte, dada a alta toxidez da amônia. Nestes casos, o tratamento consiste na administração de uma dieta pobre em proteínas ou na substituição dos aminoácidos essenciais (Seção 17.4.1) da dieta pelos seus α-cetoácidos.

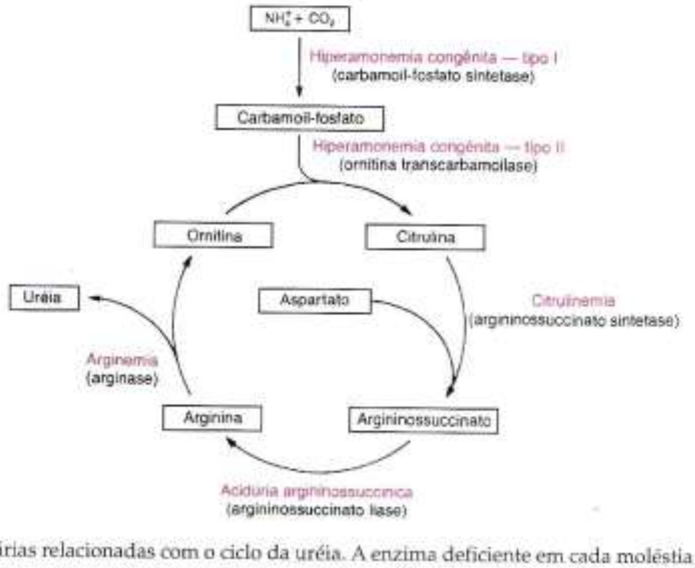


Fig. 17.26 Doenças hereditárias relacionadas com o ciclo da uréia. A enzima deficiente em cada moléstia está indicada entre parênteses.

17.4 ORIGEM DO NITROGÊNIO DOS AMINOÁCIDOS

Os diferentes organismos apresentam dependência muito variada do meio ambiente no que se refere ao suprimento de aminoácidos. Os vegetais e muitas bactérias são capazes de sintetizar todos os aminoácidos: o grupo amino é obtido a partir de amônia, e a cadeia carbônica, a partir de carboidratos. Os seres humanos, por outro lado, dependem de fornecimento externo de aminoácidos.

A fonte primária de nitrogênio para os seres vivos é o nitrogênio atmosférico (N_2), um gás muito pouco reativo, que deve ser convertido a uma forma assimilável, a amônia (Fig. 17.27 a). A conversão de N_2 a NH_3 é chamada *fixação de nitrogênio*.

Somente bactérias contêm a informação genética necessária para fixar nitrogênio. As bactérias fixadoras compreendem um grande número de espécies e habitam diversos nichos ecológicos, como solo, oceano, rios etc.; as de solo podem ser de vida livre (como os gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*) ou estarem associadas a plantas, pertencentes a todas as divisões taxonômicas das plantas terrestres. Localizam-se em diferentes partes da planta, como folhas, caules e raízes, estabelecendo sempre simbiose. O modo de interação das bactérias que fixam nitrogênio com as plantas hospedeiras é bastante variável. Por exemplo, *Azospirillum* e diversos gêneros de cianobactérias, como *Anabaena* e *Nostoc*, colonizam estruturas vegetais preexistentes, que sofrem pequenas modificações para abrigar a bactéria simbionte. Outras, como as *bactérias endofíticas* (*Herbaspirillum*, *Burkholderia*) ganham acesso ao sistema vascular e invadem diversos tecidos de plantas não-leguminosas, em geral da família das gramíneas, como milho, arroz, gramas forrageiras etc. Finalmente, as bactérias da família *Rhizobiaceae* (*Rhizobium* e outros gêneros), ao invadirem as raízes de plantas leguminosas (feijão, soja, ervilha etc.), induzem a diferenciação de nódulos complexos, equivalentes a um novo órgão do vegetal; atualmente são conhecidas cerca de 50 espécies bacterianas que estabelecem este tipo de simbiose.

A redução de N_2 a NH_3 é realizada por um sistema enzimático complexo, denominado *nitrogenase*, que utiliza ferredoxina reduzida como doador de elétrons e processa-se com grande consumo de ATP. A equação geral do processo é

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16\,ATP + 16\,H_2O \longrightarrow 2\,NH_3 + 16\,(ADP + P_i) + H_2$$

A fixação de nitrogênio por simbiose é muito mais eficiente que a obtida por bactérias de vida livre, já que a planta fornece a energia necessária ao processo, por meio da oxidação de carboidratos produzidos por fotossíntese. A quantidade de amônia produzida pelas bactérias simbiontes excede as necessidades das leguminosas e é liberada no solo, contribuindo decisivamente para o seu enriquecimento em nitrogênio. A simbiose *Rhizobiaceae*/leguminosas é o processo de fixação de nitrogênio mais eficiente. Esta é a razão da técnica de rotação de culturas, empregada na

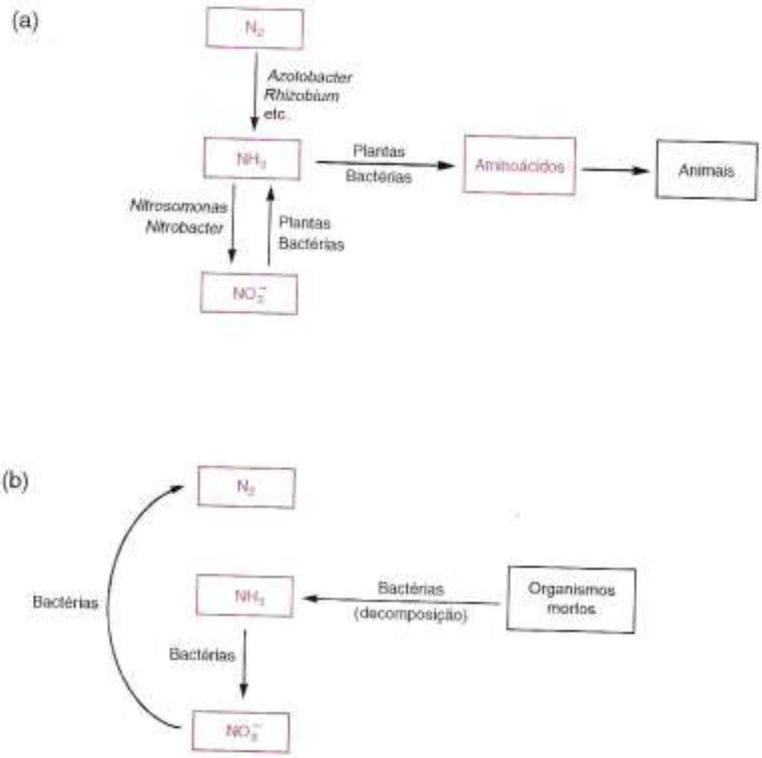


Fig. 17.27 Esquema simplificado do caminho percorrido pelo nitrogênio desde a atmosfera até os animais e vice-versa. a) O N_2 at-mosférico é reduzido a NH_3 por um grande número de espécies bacterianas; outras bactérias, muito abundantes no solo, transfor-mam a maior parte da amônia em nitritos, e, finalmente, em nitratos. A maioria das plantas e bactérias é capaz de converter es-compostos a NH_3, o precursor do grupo amino dos aminoácidos, que se tornam, então, disponíveis para os animais. b) O ciclo d-nitrogênio é mantido graças aos seguintes processos bacterianos: o nitrogênio proveniente da decomposição dos organismos é convertido a NH_3, depois a nitritos e nitratos e, finalmente, a nitrogênio gasoso.

agricultura: o cultivo de plantas não-leguminosas é alternado com o de leguminosas. Uma abordagem alternati- à rotação de culturas, que reduz os altos custos da produção industrial de fertilizantes e os danos que causam a- meio ambiente, é o desenvolvimento de plantas não-leguminosas transgênicas capazes de fixar nitrogênio. Toda-via, além da transferência dos genes que codificam o complexo nitrogenase, é preciso criar condições para que enzima funcione na planta geneticamente modificada. Por exemplo, a nitrogenase é inativada por oxigênio. N- leguminosas, este problema é resolvido pela presença, nos nódulos das raízes, de uma proteína com alta afinida- por O_2, a *leghemoglobina*, que contém um grupo heme, como a hemoglobina. A simbiose é indispensável para a s- síntese: a globina é sintetizada pela leguminosa e o grupo heme pela bactéria.

A síntese industrial de fertilizantes para a agricultura vem produzindo uma proporção crescente de NH_3, corres-pondendo atualmente a cerca de 25% do total fixado por ano. Uma fração menor de nitrogênio, de 10 a 15%, é fixad- por processos não-biológicos, como descargas elétricas e radiação ultravioleta.

A amônia presente no solo é, em grande parte, convertida a nitritos e, principalmente, a nitratos, por bactérias d- gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, por exemplo. As plantas não-leguminosas e a maioria das bactérias possuem en-zimas capazes de reduzir nitritos e nitratos a amônia, que pode ser, então, utilizada na síntese de aminoácidos e d- todos os outros compostos nitrogenados (Fig. 17.27 a). Os animais, enfatizando mais uma vez, obtêm todo o nitro-gênio necessário para a síntese de seus compostos nitrogenados na forma de aminoácidos, sintetizados por outr- organismos.

A manutenção do equilíbrio entre os diferentes reservatórios de nitrogênio do planeta deve-se, novamente, à atuação das bactérias (Fig. 17.27 b). Organismos mortos são decompostos e seu nitrogênio gera amônia; esta é convertida a nitritos e nitratos, que podem ser reconvertidos a N_2 atmosférico, fechando o chamado *ciclo do nitrogênio*.

17.4.1 SÍNTESE DE AMINOÁCIDOS

A amônia é incorporada primeiramente em glutamato e glutamina

Nos seres vivos capazes de sintetizar todos os vinte aminoácidos — plantas e microrganismos — a amônia resultante da fixação de nitrogênio é utilizada, inicialmente, para formar glutamato e glutamina. Este é o processo fundamental de incorporação direta de nitrogênio, originado de NH_4^+, como grupamentos de aminoácidos. Para a produção dos demais aminoácidos, o nitrogênio é obtido de glutamato e glutamina.

O organismo humano só sintetiza 11 dos 20 aminoácidos

O processo de síntese proteica requer que estejam presentes na célula, simultaneamente, os *vinte* aminoácidos. No organismo humano, esta condição é crítica porque nenhuma célula dispõe de reservas de aminoácidos e não são todos os aminoácidos que podem ser sintetizados. De fato, dos vinte aminoácidos encontrados nas proteínas, *nove* não podem ser sintetizados pelo ser humano (Tabela 17.3) e devem, portanto, ser obrigatoriamente obtidos pela dieta, chamando-se, por isto, *aminoácidos essenciais*. Ainda mais, dois outros aminoácidos — cisteína e tirosina — são sintetizados unicamente a partir de aminoácidos essenciais — metionina e fenilalanina — e, quando ausentes da dieta, fazem aumentar a necessidade dos aminoácidos precursores. Restam, portanto, apenas nove aminoácidos que podem ser prontamente formados a partir de compostos intermediários do metabolismo de carboidratos. Estes nove aminoácidos e os dois que são sintetizados a partir de aminoácidos essenciais são chamados *aminoácidos não-essenciais*.

Tabela 17.3 Aminoácidos essenciais e não-essenciais para os seres humanos

Essenciais	Não-essenciais
Fenilalanina	Alanina
Histidina	Arginina
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Aspartato
Lisina	Cisteína[1]
Metionina	Glutamato
Treonina	Glutamina
Triptofano	Glicina
Valina	Prolina
	Serina
	Tirosina[1]

[1]Sintetizados a partir de aminoácidos essenciais.

Nos mamíferos, à semelhança dos organismos que produzem todos os aminoácidos, o nitrogênio dos aminoácidos não-essenciais, exceto a tirosina, provém de glutamato e glutamina. Para a descrição de sua síntese, os aminoácidos não-essenciais foram agrupados segundo o composto precursor de seu esqueleto de carbono (Fig. 17.28).

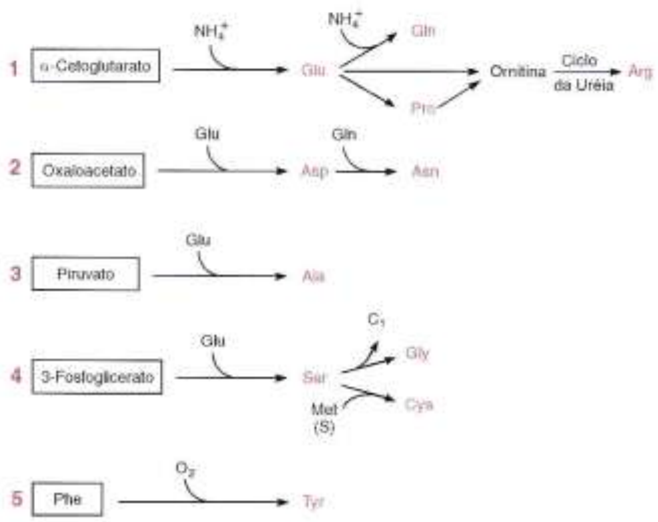


Fig. 17.28 Esquema da síntese dos onze aminoácidos não-essenciais para o organismo humano. Os aminoácidos foram reunidos em grupos (1 a 5), segundo o precursor dos seus átomos de carbono.

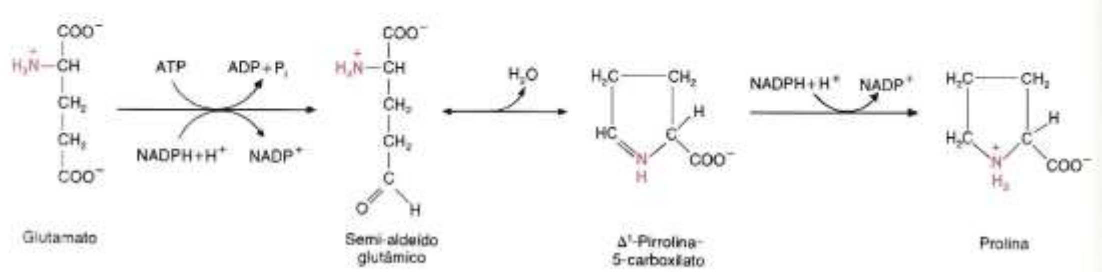
Grupo 1. Glutamato, glutamina, prolina e arginina

O α-cetoácido deste grupo de aminoácidos provém de α-cetoglutarato.

Glutamato. Formado por incorporação de NH_4^+ em α-cetoglutarato catalisada pela glutamato desidrogenase, utilizando NADPH.

Glutamina. Sintetizada a partir de glutamato e NH_4^+, pela glutamina sintetase. Note-se que, neste caso, a incorporação de NH_4^+ é feita como um grupo *amida* e, portanto, este nitrogênio não pode participar de transaminações. Todavia, por outros tipos de reações, o nitrogênio amídico pode ser utilizado nas sínteses de asparagina (ver Grupo 2) e de purinas e pirimidinas.

Prolina. Todos os seus átomos de carbono e o de nitrogênio são provenientes de glutamato. Este aminoácido é convertido a um semi-aldeído, por uma redução complexa, dependente de ATP. A eliminação de H_2O produz um composto cíclico que, novamente por redução, origina prolina:



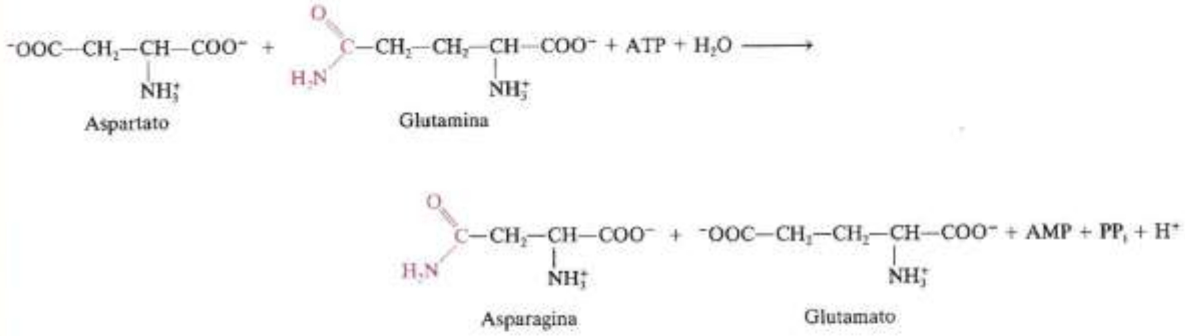
Arginina. Sintetizada a partir de citrulina, pela ação consecutiva da argininossuccinato sintetase e da argininossuccinato liase, enzimas do ciclo da uréia. No fígado, o principal local do metabolismo de arginina em animais ureotélicos, a arginina gerada por essas reações pode ser hidrolisada pela arginase. Todavia, a produção líquida de arginina é possível a partir de glutamato e prolina, que podem ser convertidos a ornitina, e esta, a citrulina pelas reações do ciclo da uréia.

No restante do organismo, um mecanismo importante de síntese de arginina envolve a cooperação entre rim e intestino delgado. No rim, graças à presença das enzimas argininossuccinato sintetase e argininossuccinato liase, a arginina é obtida a partir de citrulina e liberada na circulação. A citrulina é produzida principalmente no intestino, a partir de NH_4^+, CO_2 e ornitina, por ação de carbamoil-fosfato sintetase e ornitina transcarbamoilase, análogas às enzimas hepáticas. A ornitina pode, então, ser suprida ao rim e a diversos outros tecidos que também contêm argininossuccinato sintetase e argininossuccinato liase, embora em concentrações menores. O conhecimento a respeito do metabolismo da arginina, dada a sua complexidade, permanece incompleto.

Grupo 2. Aspartato e asparagina

Aspartato. O esqueleto de carbono provém de oxaloacetato e o grupo amino de glutamato, por transaminação catalisada pela aspartato transaminase.

Asparagina. Originada de aspartato e glutamina, que fornece o grupo amida, por ação da *asparagina sintetase*:

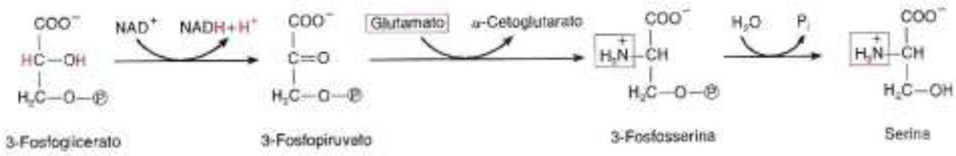


Grupo 3. Alanina

Formada por transaminação entre piruvato e glutamato, promovida pela alanina transaminase.

Grupo 4. Serina, glicina e cisteína

Serina. Origina-se de 3-fosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica, por meio de: redução, transaminação e hidrólise do grupo fosfato:



Glicina. Sua síntese ocorre, fundamentalmente, por ação da *serina hidroximetil transferase*. Esta reação, por ser reversível, também é acionada na degradação de serina (Fig. 17.10).

Cisteína. Derivada de serina, por substituição do oxigênio da hidroxila da serina por enxofre, originado de metionina, um aminoácido essencial. Esta reação faz parte da via de degradação de metionina (Fig. 17.18).

Grupo 5. Tirosina

Origina-se de hidroxilação de fenilalanina, catalisada pela fenilalanina hidroxilase (Fig. 17.23). Esta é a única reação conhecida para a fenilalanina, em indivíduos normais, além de sua participação na síntese proteica. Quando a dieta inclui tirosina, as necessidades de fenilalanina diminuem consideravelmente. Por esta razão, na análise das quantidades recomendadas de aminoácidos na dieta, costumam ser consideradas as necessidades conjuntas de fenilalanina e tirosina. O mesmo princípio é aplicado à metionina e cisteína, cujas necessidades são também somadas.

BIBLIOGRAFIA

Albinismo: http://albinismdb.med.umn.edu.

Baldani JI, Baldani VL: History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Acad Bras Cienc* **77**(3):549-579, 2005.

Brosnan JT: Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *J Nutr* 2000 **130**(4S):988S-90S.

Brosnan JT: Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* **133**(6): 2068S-2072S, 2003.

Gage DJ: Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2):280-300, 2004.

Hawkins AJS: Protein turnover: a functional appraisal. (in Essay Reviews) *Functional Ecology* **5**(2):222-233, 1991. http://www.jstor.org/view/02698463/di995326/99p00135/0.

Holmes FL: Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed Proc* **39**:216-225, 1980.

John CM, Elhai J: Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(1): 94–121, 2002.

Kornberg H: Krebs and his trinity of cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3):225-228, 2000.

Morris SM Jr: Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* **134**(10):2743S-2747S, 2004.

Newsholme P et al: Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* **36**(2):153-163, 2003.

18

Nutrição — os Substratos para as Vias Metabólicas

Os alimentos ingeridos, após digestão e absorção, originam uma grande diversidade de substâncias que são distribuídas às células, fornecendo os substratos das vias metabólicas oxidativas e biossintéticas, além de vitaminas e sais minerais. O funcionamento global do organismo depende da quantidade e da qualidade dos nutrientes ingeridos. O objetivo deste capítulo é fornecer noções básicas sobre a composição de uma dieta balanceada, indispensável para a manutenção de um estado saudável.

18.1 NUTRIÇÃO PROTEICA

As proteínas constituintes dos organismos, quaisquer que sejam as suas funções, estão sempre sendo degradadas e sintetizadas. A reciclagem de proteínas alimenta e utiliza um conjunto de aminoácidos, que deve ser entendido não como um reservatório estático, mas como moléculas "em trânsito" entre os processos de síntese e degradação. Este conjunto precisa ser continuamente suprido por aminoácidos exógenos, por várias razões:

1. O conjunto de aminoácidos nunca é integralmente aproveitado para sínteses, porque as proteínas sintetizadas em um dado instante não são as mesmas que estão sendo degradadas: os aminoácidos não utilizados, ainda que sejam aminoácidos essenciais, são oxidados.
2. A gliconeogênese utiliza seletivamente os esqueletos de carbono dos aminoácidos glicogênicos, retirando-os do conjunto em proporções significativas.
3. Determinados aminoácidos são utilizados, em quantidades consideráveis, na síntese de compostos nitrogenados não-proteicos e seu nitrogênio é eliminado na urina ou nas fezes. Entre estes compostos estão a creatinina (resultante da degradação de fosfocreatina, uma reserva energética do músculo), o ácido úrico (produto de degradação das purinas) e a bilirrubina e outros pigmentos (derivados do catabolismo do grupo heme).
4. Existe uma reconstituição contínua de proteínas cujos aminoácidos não retornam ao conjunto: são as proteínas constituintes de mucosas, epiderme, cabelos, pêlos, unhas etc.

Há, portanto, uma perda constante de nitrogênio no organismo humano. Esta perda existe mesmo quando um indivíduo é submetido, por vários dias, a uma dieta isenta de proteínas. Em experimentos deste tipo, um homem adulto de 70 kg excreta 3,7 g/dia de nitrogênio, equivalente a 23 g de proteína[1], que, portanto, é a excreção mínima obrigatória. Se o jejum for completo, a eliminação de proteína chega a 80 g/dia.

[1] Como a composição das proteínas tem, em média, 16% de nitrogênio (N), costuma-se adotar a seguinte fórmula de conversão: Proteína = N × 6,25.

Com uma dieta balanceada, um indivíduo adulto excreta cerca de 16 g de nitrogênio por dia, correspondendo a 100 g de proteína. A *única* forma de repor esta perda e manter estável o conjunto de aminoácidos, de maneira a não restringir a síntese de proteínas e compostos nitrogenados, é a ingestão de proteínas.

As proteínas dos alimentos são digeridas e seus aminoácidos são transportados para as células. A digestão é obtida por hidrólise catalisada por enzimas proteolíticas presentes no trato digestório, iniciando-se no estômago e completando-se no intestino delgado. Os aminoácidos resultantes são absorvidos pela mucosa intestinal e distribuídos para os tecidos, que, portanto, recebem um conjunto de aminoácidos cuja composição varia de acordo com as proteínas da alimentação.

18.1.1 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Um indivíduo adulto encontra-se em equilíbrio nitrogenado

A avaliação do metabolismo proteico de um indivíduo pode ser feita pelo balanço de nitrogênio, a medida mais comumente utilizada para este fim. O *balanço de nitrogênio* é a diferença entre a quantidade de nitrogênio ingerido e a quantidade de nitrogênio excretado. A excreção de nitrogênio se dá, fundamentalmente, por meio da uréia eliminada na urina (em média, 90% do total excretado) e de proteínas presentes nas fezes, derivadas de proteínas não digeridas, da descamação da mucosa intestinal e também da flora intestinal. Deve-se ressaltar que o balanço de nitrogênio não é exatamente equivalente ao balanço proteico devido à: (1) existência de compostos nitrogenados não-proteicos nos alimentos, (2) utilização de nitrogênio para a síntese de compostos nitrogenados não-proteicos do organismo, significando retenção de nitrogênio, mas não de proteína, e (3) dificuldade de medir a excreção de nitrogênio por vias minoritárias, mas significativas, como a transpiração, crescimento de cabelos e unhas, descamação da pele etc., que, muitas vezes, não são computadas no cálculo do balanço nitrogenado. Portanto, o balanço de nitrogênio é um método *aproximado* de avaliação do balanço proteico.

Em um indivíduo adulto com dieta adequada, a eliminação equivale à ingestão e o balanço de nitrogênio é igual a zero: o estado é de *equilíbrio nitrogenado*. Quando aumenta o conteúdo proteico da dieta oferecida a um indivíduo em equilíbrio nitrogenado, após um período de adaptação, aumenta também a excreção de nitrogênio: a ingestão aumentada é compensada por uma maior eliminação de nitrogênio, permanecendo a condição de equilíbrio, embora com valores absolutos maiores. O conteúdo proteico de um indivíduo adulto não pode, portanto, ser aumentado apenas com a dieta. O excesso de proteína ingerida é armazenado como gordura.

As situações em que se estabelece um *balanço de nitrogênio positivo*, ou seja, excreção de nitrogênio menor do que ingestão, são bastante particulares. Balanços positivos são verificados apenas quando há aumento real do conteúdo proteico por formação efetiva de tecido, como durante o crescimento, gravidez, lactação e convalescença.

O *balanço de nitrogênio negativo* ocorre quando a eliminação é maior do que a ingestão. As condições que acarretam balanço de nitrogênio negativo são, além do jejum, dietas pobres em proteínas ou contendo proteínas de baixo valor biológico e dietas pobres em carboidratos. Diversas condições patológicas, como diabetes, câncer, infecções e situações de perda significativa de tecidos, como queimaduras graves, cirurgias etc., também provocam balanço negativo.

18.1.2 VALOR NUTRICIONAL DAS PROTEÍNAS

Os alimentos de origem animal têm alto teor de proteína

Um dos parâmetros a ser considerado quando se avalia a importância de um alimento como fonte de proteína é o seu *conteúdo proteico*, geralmente expresso em gramas de proteína por 100 g de alimento (%). A Tabela 18.1 mostra que os alimentos mais ricos em proteína são as carnes e os produtos derivados de animais, como laticínios e ovos, que chegam a conter de 10 a 100 vezes mais proteína que os alimentos vegetais. A grande maioria dos alimentos vegetais — cereais, verduras, legumes, frutas, tubérculos etc. — são pobres em proteína, com exceção das leguminosas (soja, feijão, ervilha, amendoim etc.), e, do ponto de vista das necessidades proteicas, são inadequados. Os alimentos básicos dos países em desenvolvimento, assim como os constituintes de dietas vegetarianas, têm baixo teor proteico. A dieta típica da população brasileira de baixa renda costuma ser constituída, fundamentalmente, por uma mistura de três partes de arroz e uma de feijão, mistura esta que tem baixa concentração de proteína, em torno de 8%.

O real valor nutricional de um alimento, todavia, é refletido pela qualidade das proteínas que o compõem. A qualidade nutricional de uma proteína é aferida pela sua capacidade de prevenir alterações do conteúdo proteico do indivíduo quando apenas a proteína em questão é oferecida na dieta como fonte de nitrogênio; a ocorrência ou não de espoliação proteica é monitorada por medidas do balanço de nitrogênio. Alternativamente, a qualidade das proteínas presentes em um alimento é avaliada por comparação da sua composição em aminoácidos e da sua digestibilidade com os mesmos parâmetros medidos na ovalbumina ou caseína, proteínas consideradas como padrão de referência.

Tabela 18.1 Conteúdo proteico de alimentos

Alimento[1]	Teor de proteína (g/100 g de alimento)
Carne bovina	27
Queijo prato	26
Fígado bovino	26
Carne de frango	24
Carne de porco	24
Peixe	23
Soja	17
Ovo	13
Feijão	6,0
Ervilha	6,0
Aveia	3,7
Leite de vaca[2]	3,5
Milho	2,4
Arroz	2,0
Batata	1,9
Banana	1,3
Gelatina[3]	1,2
Cenoura	1,0
Laranja	0,84
Mandioca	0,65
Maçã	0,21

[1]Alimentos cozidos, exceto frutas e cenoura.
[2]Leite contém caseína, uma proteína de excelente valor nutricional, mas tem alto teor de água.
[3]Alguns produtos comercializados como *gelatina* contêm, predominantemente, carboidratos.

A qualidade nutricional das proteínas depende da sua digestibilidade e composição

As propriedades que definem a qualidade alimentar de uma proteína são a sua digestibilidade e a adequação do seu conteúdo em aminoácidos para compor as proteínas endógenas.

A *digestibilidade* é uma medida do percentual da proteína ingerida que é digerida e efetivamente absorvida no trato gastrointestinal e, portanto, oferecida aos tecidos, sob a forma de aminoácidos. A parte não digerida é, naturalmente, eliminada nas fezes. Calcula-se a digestibilidade a partir de medidas do conteúdo de nitrogênio do alimento (N ingerido) e do nitrogênio nas fezes (N fezes). A diferença entre os dois valores corresponde ao nitrogênio absorvido (N absorvido) (Fig. 18.1), e a digestibilidade (D) é expressa como:

$$D = \frac{N_{ingerido} - N_{fezes}}{N_{ingerido}} \times 100 \quad \text{ou} \quad D = \frac{N_{absorvido}}{N_{ingerido}} \times 100$$

A digestibilidade das proteínas sofre interferência de diferentes fatores, alguns deles resultantes do processamento dos alimentos. O aquecimento geralmente aumenta a digestibilidade das proteínas, por causar desnaturação, facilitando, assim, a hidrólise pelas enzimas digestivas. Por outro lado, a utilização de altas temperaturas na presença de



Fig. 18.1 Parâmetros para avaliar a qualidade nutricional das proteínas. A digestibilidade relaciona a quantidade de nitrogênio (N) absorvido com a quantidade de nitrogênio ingerido; o NPU compara o nitrogênio ingerido e o retido.

Tabela 18.2 Valores de digestibilidade de proteínas

Alimento	Digestibilidade (%)
Ovo	97
Leite, queijo	95
Carne, peixe	94
Arroz polido	88
Milho	85
Feijão	78

açúcares redutores decresce a digestibilidade das proteínas: estes açúcares formam ligações covalentes com o grupo ε-amino da lisina, que não podem ser rompidas pelas enzimas digestivas.

O grau de digestibilidade de uma proteína é, ainda, determinado por sua natureza intrínseca: a grande maioria das proteínas de origem animal exibem valores altos de digestibilidade quando comparadas a proteínas de origem vegetal (Tabela 18.2). As proteínas vegetais são, freqüentemente, envolvidas por paredes celulares que têm alto teor de compostos não-digeríveis, o que dificulta o acesso das enzimas digestivas às proteínas. Algumas plantas, como a soja, contêm inibidores de enzimas digestivas, que devem ser inativados antes de seu consumo.

Ainda que a digestibilidade seja alta, uma proteína pode apresentar baixo valor nutricional, em virtude do seu conteúdo inadequado de *aminoácidos essenciais*. A gelatina, por exemplo, tem alta digestibilidade, mas é uma proteína de baixa qualidade, porque é deficiente em aminoácidos essenciais, representando a exceção entre as proteínas animais. Para que uma proteína seja nutricionalmente satisfatória, deve conter aminoácidos essenciais em proporções adequadas à síntese das proteínas humanas. Uma proteína hipotética, a polimetionina, ainda que completamente digerida e absorvida, não seria capaz de manter o equilíbrio nitrogenado, pois a metionina não poderia ser utilizada na síntese proteica, por falta dos outros aminoácidos essenciais. A metionina seria oxidada e seu nitrogênio, excretado como uréia. A ausência de um aminoácido essencial em uma refeição provoca grande diminuição na síntese proteica, cujos valores normais só chegam a ser retomados se o aminoácido ausente for ingerido em um prazo máximo de 3 a 4 horas. Em resumo, proteínas deficientes em apenas um aminoácido essencial são incapazes de manter o equilíbrio nitrogenado quando constituem a única proteína da dieta, independentemente da quantidade ingerida.

Um índice que revela a real qualidade nutricional de uma proteína é o *NPU* (*Net **P**rotein **U**tilization*). O NPU (Fig. 18.1) mede a fração de nitrogênio ingerido que é efetivamente retido, ou seja, que origina os compostos nitrogenados do organismo. A quantidade de nitrogênio retido corresponde à diferença entre o nitrogênio ingerido e o nitrogênio excretado nas fezes e na urina:

$$\text{NPU} = \frac{N_{\text{retido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100 \quad \text{ou} \quad \text{NPU} = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{excretado}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

As proteínas de origem animal exibem altos valores de digestibilidade e conteúdo adequado de aminoácidos e têm, conseqüentemente, valores elevados de NPU (Tabela 18.3): são as proteínas de carnes, peixes, ovos e leite; a gelatina é

Tabela 18.3 Valores de NPU de alimentos

Alimento	NPU (%)
Leite humano	95
Ovo	90
Leite de vaca	81
Carne bovina	70
Arroz polido	60
Farinha de soja	58
Amendoim	50
Trigo integral	45
Milho	40

uma exceção. As proteínas vegetais têm digestibilidade menor e deficiência de um ou mais aminoácidos essenciais, o que está refletido nos seus índices de NPU, também menores.

Embora existam outros parâmetros para avaliar o valor nutricional de proteínas, o NPU costuma ser o mais utilizado.

18.1.3 QUANTIDADES RECOMENDADAS DE PROTEÍNA NA DIETA

A ingestão proteica mínima depende do NPU das proteínas

A quantidade de proteína na dieta necessária para a manutenção do conteúdo proteico do organismo (equilíbrio nitrogenado) depende de diversos fatores, principalmente do valor do seu NPU. As doses mínimas de proteína recomendadas não têm significado se não forem especificadas as proteínas que compõem a dieta. Além disso, a dose mínima varia segundo o teor de carboidratos e lipídios da dieta e de acordo com a idade e o sexo dos indivíduos. Os estudos nutricionais levam à recomendação de uma dose mínima diária de 0,8 g de proteína por quilo de peso corpóreo, considerando-se a ingestão de proteínas de alto NPU, como as de origem animal. Esta dose corresponde, aproximadamente, a 56 g para um homem de 70 kg e 44 g para uma mulher de 55 kg. A necessidade proteica da criança, que apresenta um balanço de nitrogênio positivo, é proporcionalmente maior do que a do adulto, chegando a 2,5 g por quilo de peso. Durante a gravidez e lactação, recomenda-se, em média, uma ingestão adicional diária de 10 e 20 g de proteína, respectivamente, para sustentar a síntese tecidual (da mãe e do feto) e a formação do leite.

As doses mínimas recomendadas são satisfatórias para os habitantes de países desenvolvidos, onde as dietas habituais são compostas de proteínas de alta qualidade. Nos Estados Unidos, por exemplo, 70% do total de proteínas consumidas são de origem animal e 30% de origem vegetal. Por outro lado, as proteínas presentes na dieta da maior parte da população mundial têm valores de NPU muito inferiores; no Brasil, 70% das proteínas consumidas são de origem vegetal. Quando a ingestão proteica é feita com proteínas de baixa qualidade, os valores recomendados devem ser corrigidos para, no mínimo, 1,4 g de proteína por quilo de peso, o que corresponde a 100 g por dia para um homem adulto.

Uma forma compensatória para a má qualidade das proteínas é ingerir, de preferência em uma mesma refeição, proteínas com deficiências de aminoácidos essenciais diferentes, para que se obtenha o chamado *efeito complementar* das proteínas. Este cuidado deve ser tomado quando se planeja uma dieta vegetariana. Os produtos vegetais, como já foi assinalado, apresentam (1) conteúdo proteico muito inferior aos produtos de origem animal, (2) deficiências de aminoácidos essenciais e (3) baixa digestibilidade. Uma dieta vegetariana que possa suprir as necessidades proteicas mínimas de indivíduos adultos deve conter uma grande variedade, e uma grande quantidade, de proteínas que apresentem efeito complementar. Por exemplo, as proteínas dos cereais (arroz, por exemplo) são deficientes em lisina, e às proteínas das leguminosas (feijão, por exemplo) falta metionina. Uma mistura de arroz e feijão pode, então, fornecer o conjunto completo de aminoácidos essenciais, porém, em quantidades insuficientes. Assim sendo, uma dieta vegetariana satisfatória deve sempre ser complementada com proteínas de boa qualidade, como as de ovos e laticínios. Dietas vegetarianas não são recomendadas, em especial para crianças, gestantes e lactantes. Além dos problemas referentes à necessidade proteica, este tipo de dieta é muito rico em fibras, que causam menor absorção de nutrientes em geral. Ainda mais, os alimentos vegetais não contêm ácidos graxos poliinsaturados ω-3 de cadeia longa, que são fundamentais para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso central. Como este desenvolvimento é mais acelerado do início do terceiro trimestre de gestação até cerca de 18 meses após o nascimento, a falta desses ácidos graxos durante este período é crítica.

Os ruminantes constituem uma exceção entre os mamíferos, no que concerne à ingestão proteica, porque podem sobreviver à custa de vegetais (pastagem). Nestes animais, a maior parte da uréia produzida é transferida do sangue para o rúmen. Esta parte do sistema digestivo é habitada por microrganismos que utilizam a uréia como fonte de nitrogênio para sintetizar aminoácidos. A digestão de grande parte destas bactérias em porções distais do trato gastrointestinal satisfaz as necessidades proteicas dos ruminantes.

Outro fator que interfere nas doses mínimas recomendadas de proteína é o suprimento energético da dieta sob a forma de carboidratos e lipídios: sua ingestão concomitante reduz a utilização de proteínas como fonte de energia.

18.2 INGESTÃO CALÓRICA

18.2.1 DISPÊNDIO DE ENERGIA

Embora uma fração (10-15%) dos aminoácidos constituintes das proteínas da dieta seja sempre oxidada, a maior parte destina-se a servir como precursores para a síntese das proteínas características do organismo e demais compostos nitrogenados. Com os carboidratos e lipídios passa-se o oposto: destinam-se, em geral, a ser oxidados e, deste

modo, fornecer energia para os processos vitais. A necessidade energética[2] de um indivíduo é composta de uma parte constante, que atende os gastos inevitáveis (metabolismo basal), e uma parte variável.

A *taxa metabólica basal* é a quantidade de energia necessária para a manutenção dos processos vitais básicos: atividade metabólica das células, trabalho osmótico, bombeamento do sangue, respiração, atividade renal, do sistema nervoso etc. O transporte ativo através das membranas celulares e o funcionamento do sistema nervoso central consomem mais de 50% dos gastos energéticos basais. A taxa metabólica basal é medida pela produção de calor ou pelo oxigênio consumido por um sujeito em repouso e acordado, 12 horas após a última refeição. É proporcional à área de superfície corpórea, mais diretamente à massa magra (músculos, ossos e vísceras, ou seja, o peso corpóreo menos o peso da massa adiposa); é também relacionada à idade e ao sexo. Corresponde, em média, a 1.800 kcal/dia (7.530 kJ) para homens e 1.400 kcal/dia (5.850 kJ) para mulheres. O consumo de energia por minuto gira em torno de 1 kcal, um pouco menos do que isto para mulheres e um pouco mais para homens — 1 kcal/min corresponde, aproximadamente, ao calor liberado por uma vela ou por uma lâmpada de 75 watts acesas.

A variável que mais interfere no consumo energético é a intensidade da atividade física: entre o repouso e o exercício intenso, o dispêndio de energia pode aumentar em até dez vezes. O gasto total de energia é a soma da taxa metabólica basal e da energia gasta nas diferentes atividades diárias (Tabela 18.4).

Tabela 18.4 Consumo de energia por um homem adulto durante diferentes atividades

Tipo de atividade	kcal/h	kJ/h
Muito leves: ler, escrever, ver TV	110	460
Leves: dirigir, andar devagar, lavar louça	220	920
Moderadas: andar depressa, dançar, andar de bicicleta	370	1.550
Intensas: nadar, correr, jogar futebol ou basquetebol	580	2.430

As doses recomendadas de ingestão calórica, ao contrário das quantidades de proteína, não apresentam valores constantes por quilo de peso. São estabelecidas como o menor valor compatível com a manutenção da saúde e um grau apropriado de atividade física, considerando-se o sexo e a faixa etária; para mulheres grávidas ou lactantes, são acrescidas das necessidades energéticas associadas com a formação de tecidos ou secreção do leite (Tabela 18.5). À se-

Tabela 18.5 Ingestão calórica diária recomendada para indivíduos adultos

		Energia necessária	
	Idade (anos)	kcal	kJ
Homens			
	19-30	2.980	12.468
	31-50	2.637	11.033
	51-70	2.224	9.305
	71-74	2.026	8.477
Mulheres			
	19-30	1.890	7.908
	31-50	1.752	7.330
	51-70	1.543	6.456
	71-74	1.531	6.406
Grávidas[1]		+300	+1.250
Lactantes[1]		+500	+2.090

[1]Calorias adicionais às doses recomendadas.

[2]As necessidades energéticas são expressas em quilocalorias (kcal), mais comumente, ou em quilojoules (kJ); uma quilocaloria equivale a 4,184 quilojoules.

melhança do equilíbrio nitrogenado, deve haver um *equilíbrio energético*, ou seja, a ingestão calórica deve contrabalançar o gasto de energia de modo a manter um peso corpóreo constante. Uma ingestão calórica insuficiente leva a um balanço energético negativo: a mobilização das reservas energéticas (lipídios) provoca perda de peso. Por outro lado, dietas hipercalóricas resultam em ganho de peso, por aumento do depósito de gordura.

A obesidade pode ser devida a fatores genéticos

A *obesidade* constitui um problema de saúde pública de proporções epidêmicas em países industrializados, especialmente nos Estados Unidos, em contraste com a desnutrição a que está submetida uma grande parcela da população mundial. Todavia, a partir da última década, a incidência de obesidade tem crescido também nos países em desenvolvimento, tanto em adultos, como em crianças e adolescentes.

O estado nutricional de um indivíduo adulto pode ser avaliado pela medida do seu Índice de Massa Corporal (IMC), que é igual ao peso corporal (em kg) dividido pela altura (em metros) ao quadrado:

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso}}{\text{altura}^2}$$

Este índice reflete a quantidade de gordura corpórea, permitindo uma avaliação aproximada do grau de obesidade; de modo geral, um indivíduo é considerado obeso se apresentar IMC maior do que 30 (Tabela 18.6). A definição das diferentes categorias de IMC baseia-se em projeções estatísticas do peso corpóreo ideal, ou seja, aquele associado com os menores índices de morbidade e mortalidade.

Tabela 18.6 Valores de IMC (Índice de Massa Corporal) e estado nutricional de indivíduos adultos

Abaixo do peso	Peso desejável ("normal")	Sobrepeso	Obesidade	Obesidade mórbida
< 20	20-24,9	25-29,9	30-40	> 40

A obesidade está associada a uma menor expectativa de vida, por constituir um fator de risco importante para o desenvolvimento de várias doenças crônicas, como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, câncer etc. Resulta, quase sempre, de uma superalimentação, sendo excepcionalmente devida a problemas hormonais. O tratamento mais adequado é, portanto, a redução da ingestão calórica. Para emagrecimento e manutenção de um estado saudável, esta redução deve incidir sobre os componentes não-essenciais da dieta: carboidratos e lipídios. A ingestão proteica deve ser preservada, pois, além de indispensável, raramente é responsável pelo excedente alimentar. A prática regular de exercícios, e não a atividade esporádica, propicia a perda de peso, por induzir um aumento da taxa metabólica basal e da degradação de lipídios.

A causa da obesidade é, sem dúvida, a ingestão calórica em excesso às necessidades energéticas; todavia, a razão para que este desajuste ocorra é desconhecida. De fato, o controle do consumo de alimentos (da saciedade) e do equilíbrio energético é complexo e mal compreendido e fica cada vez mais evidente o envolvimento de componentes genéticos. Ou seja, haveria uma predisposição genética para a superalimentação.

Em 1994, foi identificado o gene OB (de ***OB**ESE*) de camundongos e os seus homólogos em seres humanos. O gene OB codifica uma proteína, a *leptina* (do grego *leptós*, que significa delgado, magro), que é sintetizada principalmente nos adipócitos e secretada na corrente sangüínea; age como um hormônio, ligando-se a um receptor específico no hipotálamo, reduzindo o apetite e aumentando o gasto de energia.

A leptina, em camundongos e ratos, funciona como um sensor molecular do teor de gordura armazenada nos adipócitos: quando o estoque de gordura é adequado, os níveis de leptina são altos, limitando a ingestão de alimentos. Durante o jejum, os níveis de leptina diminuem e a alimentação é promovida. Camundongos homozigotos para os alelos defectivos do gene *ob* (*ob/ob*) sintetizam leptina não-funcional e têm peso corpóreo três vezes maior do que os camundongos normais. Os animais da linhagem ob/ob comportam-se como se estivessem permanentemente em jejum, superalimentando-se e tornando-se obesos e diabéticos; a administração de leptina a esses mutantes resulta em diminuição da tomada de alimento, do peso corpóreo e dos níveis plasmáticos de glicose e insulina, além de aumentar o gasto de energia. Mutações no gene do receptor de leptina também levam à obesidade em camundongos e ratos.

Inicialmente, acreditou-se que a leptina poderia constituir uma terapia indicada também para a obesidade humana. Porém, a grande maioria dos seres humanos obesos são diferentes dos camundongos obesos, por apresentarem [illegible]

sangüíneos de leptina elevados e por não serem portadores de genes defectivos para a leptina ou para o seu receptor, isto é, produzem leptina e receptor normais. Uma hipótese considerada atualmente é que o sistema nervoso central dos obesos seria resistente à leptina, em analogia à resistência à insulina dos diabéticos.

O quadro do controle da obesidade humana tornou-se ainda mais confuso graças à descrição de alguns casos isolados de indivíduos severamente obesos que eram portadores de genes defectivos de leptina e/ou do seu receptor, nos quais o tratamento com leptina foi capaz de reverter a hiperfagia e o ganho de peso. Ou seja, casos semelhantes aos camundongos obesos.

Vários outros hormônios, além da leptina, têm sido relacionados com a manutenção do equilíbrio energético. Eles incluem hormônios sintetizados pelo tecido adiposo, estômago, intestinos, além da própria insulina, agindo no hipotálamo. As proteínas desacopladoras mitocondriais também interferem no controle da obesidade, por levarem à redução da quantidade de ATP sintetizado durante o metabolismo oxidativo.

O tratamento da obesidade pode tomar novos rumos, diante do acúmulo de evidências de que o peso corpóreo possa ser geneticamente programado. Por enquanto, o único tratamento efetivo, a longo prazo, é reduzir a ingestão de alimentos, o fator mais importante, e aumentar o gasto energético.

18.2.2 CONTRIBUIÇÃO DOS ALIMENTOS PARA A INGESTÃO CALÓRICA

A produção calórica por oxidação de carboidratos, proteínas e lipídios está indicada na Tabela 18.7. Qualquer destes três tipos de compostos pode suprir a demanda energética alimentar. A proporção em que estes nutrientes devem entrar na composição da dieta depende, entretanto, de várias considerações. Os alimentos ricos em carboidratos são muito abundantes e de custo mais baixo. As dietas ricas em lipídios estão relacionadas com a incidência de moléstias diversas. O baixo teor de proteínas da maioria dos alimentos e o alto custo daqueles contendo proteínas de alto NPU inviabilizam uma ingestão proteica em quantidades maiores do que a dose mínima. Estes fatores determinam que a maior proporção de ingestão calórica seja constituída por alimentos ricos em carboidratos.

Tabela 18.7 Valores aproximados de energia derivada da oxidação de compostos da dieta

	Energia	
Compostos	kcal/g	kJ/g
Carboidrato	4	17
Proteína	4	17
Lipídio	9	38
Etanol[1]	7	29

[1]O álcool, consumido com moderação (2% das calorias ingeridas), é considerado como fonte de energia.

A recomendação atual é que o suprimento energético seja fornecido por uma dieta contendo cerca de 60% de carboidratos, 25-30% de lipídios e 10-15% de proteínas.

Uma quantidade mínima de carboidratos deve ser consumida

A maior parte dos carboidratos da dieta deve ser constituída por polissacarídios, como o amido; açúcares, como a sacarose, devem compor uma fração menor. O amido é encontrado principalmente em cereais e seus derivados (pães, massas), raízes e tubérculos (mandioca, batata), e a sacarose, em alimentos doces, mel etc.

Uma maior ingestão de açúcares, em relação a polissacarídios, determina aumento dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis e redução daqueles de HDL-colesterol, resultando em maior risco de ocorrência de doenças cardiovasculares. Estas alterações são atenuadas pela presença de polissacarídios não-digeríveis na dieta. Adicionalmente, os alimentos ricos em açúcares são, na maioria das vezes, pobres em nutrientes essenciais.

Em dietas hipocalóricas, a frutose costuma ser recomendada em substituição à glicose, por não estimular a secreção de insulina pelas células β do pâncreas. Todavia, esta conduta tem sido questionada, porque o consumo elevado de frutose resulta em mudanças desfavoráveis do perfil de lipídios plasmáticos, mais acentuadas do que as provocadas pelos açúcares em geral.

É necessário ingerir um mínimo de 5 g de carboidratos por 100 kcal ingeridas: 130 g para uma dieta de 2.600 kcal. A ingestão de quantidades menores tem como conseqüência a hipoglicemia, compensada pela intensificação da gliconeogênese a partir de aminoácidos, levando à espoliação proteica e, portanto, a um balanço de nitrogênio negativo. Fica evidente, portanto, a ação poupadora de proteínas desempenhada pelos carboidratos. Ademais, quando a demanda energética é suprida pela oxidação de lipídios, sem ser acompanhada pela oxidação de carboidratos, advém a cetose.

As doses recomendadas de proteínas pressupõem, portanto, a ingestão concomitante de doses adequadas de carboidratos e lipídios, de modo que a maior parte das proteínas exógenas possa ser utilizada na reposição das proteínas endógenas, e não como fonte de energia.

Alguns polissacarídios presentes nos alimentos não são utilizados pelos seres humanos como fonte de energia: são componentes das *fibras dietéticas*.

Os alimentos vegetais são ricos em fibras dietéticas

O termo *fibra dietética* refere-se a componentes dos alimentos que sejam resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas do estômago e intestino delgado dos seres humanos e que sofram fermentação de grau variado pelos microrganismos presentes no intestino grosso (cólon). Incluem-se nesta definição os compostos estruturais presentes nas partes comestíveis de vegetais — em geral polissacarídios, dos quais o principal é a celulose — e oligossacarídios obtidos industrialmente, como a inulina, composta por unidades de frutose e glicose.

As fibras dietéticas são classificadas, de acordo com a sua solubilidade em água, em dois tipos — solúveis e insolúveis —, aos quais se atribuem efeitos fisiológicos diferentes.

As *fibras solúveis* são constituídas por heteropolissacarídios (formados por monossacarídios diferentes) ramificados, como as pectinas, gomas e mucilagens. Determinam um aumento da viscosidade do conteúdo do intestino delgado e são extensamente fermentadas por bactérias durante o trânsito pelo cólon. Fontes importantes de fibras solúveis são: polpa de frutas, legumes, aveia, cevada, milho, lentilha, feijões e outras leguminosas.

As *fibras insolúveis*, das quais a mais abundante é a celulose, são mais resistentes à fermentação no cólon. São encontradas em cereais integrais (principalmente trigo) e alimentos deles derivados, e em leguminosas, legumes, verduras, frutas e sementes em geral.

Uma dieta mista contendo alimentos ricos em fibras oferece maior proteção contra doenças crônicas do que fibras purificadas adicionadas aos alimentos. A dose recomendada para adultos saudáveis é de 20-35 g/dia. Essa quantidade é obtida ingerindo-se de 2 a 4 porções de frutas e de 3 a 5 porções de legumes e verduras por dia. Legumes, verduras e frutas, devido ao seu alto teor de água, têm baixas concentrações de fibras, que variam de 1 a 3% (g/100 g de peso úmido); nos cereais integrais, as concentrações são maiores, chegando a 12% no trigo integral.

As fibras dietéticas produzem diversos efeitos benéficos à saúde

O consumo de fibras, sobretudo fibras solúveis, diminui os níveis de colesterol plasmático. Elas ligam-se a sais biliares, aumentando a sua excreção; os sais biliares perdidos nas fezes são repostos a partir do colesterol, o que diminui o teor de colesterol circulante. Além disto, a fermentação das fibras pelas bactérias intestinais produz ácidos graxos de cadeia curta que parecem inibir a síntese de colesterol no fígado.

Adicionalmente, as fibras viscosas reduzem o aumento pós-prandial de glicose no sangue, por retardarem o esvaziamento gástrico e a absorção intestinal de glicose. São, por isto, recomendadas para indivíduos diabéticos, que passam a necessitar de doses menores de insulina para o controle da glicemia.

Fibras que são incompleta ou lentamente fermentadas pela microflora no intestino grosso — principalmente fibras insolúveis, como a celulose — promovem aumento da massa fecal, o que estimula o peristaltismo e acelera o trânsito intestinal. Este tipo de fibra deve compor dietas para prevenir ou tratar a constipação intestinal e o desenvolvimento de hemorróidas, diverticulose e diverticulite.

Uma refeição rica em fibras é processada mais lentamente e tem volume maior que uma refeição com baixo teor de fibra, acarretando uma sensação de saciedade maior, além de ser, em geral, menos calórica. Por estas características, as fibras são indicadas para combater e prevenir a obesidade.

Doses exageradas de fibras dietéticas podem causar resultados adversos

Os efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico promovidos por alta ingestão de fibras são considerados benéficos para indivíduos diabéticos e/ou com doenças cardiovasculares. Por outro lado, discute-se a possibilidade de que as

fibras causem diminuição da absorção de macro- e micronutrientes, por terem efeito laxativo e por interagirem com nutrientes, formando complexos insolúveis no lúmen do intestino. Esta ação complexante, todavia, seria exercida por outros compostos presentes nos alimentos ricos em fibras e não pelas próprias fibras. Este seria o caso do *fitato* (inositol hexafosfato), que atua como reserva de fosfato para o metabolismo energético de vegetais. Assim, a redução da biodisponibilidade de nutrientes causada pelo aumento da tomada de fibras permanece em discussão.

Os lipídios da dieta fornecem os ácidos graxos essenciais

Os lipídios mais abundantes nos alimentos são os triacilgliceróis, constituintes dos óleos e das gorduras. Do ponto de vista do fornecimento de energia, são compostos dispensáveis, podendo ser substituídos por carboidratos; por outro lado, são imprescindíveis por conterem os *ácidos graxos essenciais* e por serem o veículo para a absorção das *vitaminas lipossolúveis*. Dois ácidos graxos são considerados essenciais para o organismo humano: *linoleico* (ω-6) e *α-linolênico* (ω-3). Os ácidos graxos essenciais têm papel fundamental no crescimento normal e no funcionamento adequado do organismo, em especial do sistema nervoso; além de serem precursores dos eicosanóides, acredita-se que eles mesmos possam atuar como mensageiros intracelulares. Como os lipídios geralmente perfazem uma fração significativa da dieta, deficiências de ácidos graxos essenciais são raras, tornando-se mais freqüentes quando a alimentação é parenteral.

Para satisfazer as necessidades de ácidos graxos essenciais, são recomendados os óleos vegetais, que têm alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados. As gorduras de origem animal são, em geral, muito mais ricas em ácidos graxos saturados do que aquelas de fontes vegetais. O óleo de coco, de algumas palmeiras tropicais e de cacau são exemplos raros de óleos vegetais ricos em ácidos graxos saturados (Tabela 18.8).

O ácido graxo poliinsaturado presente em maior concentração nos óleos vegetais comumente consumidos pelos seres humanos é o ácido linoleico (ω-6). Quanto à família de ácidos graxos ω-3, somente alguns óleos, como os de soja e canola, contêm apenas o ácido α-linolênico, e em quantidades reduzidas (Tabela 18.9). O óleo de linhaça é particularmente rico em α-linolênico (55%), mas não é um óleo habitualmente utilizado. Ácidos graxos ω-3 de cadeia mais lon-

Tabela 18.8 Composição[1] em ácidos graxos de gorduras de origem animal e vegetal

	Ácidos graxos		
	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados
Gorduras animais			
Peixes marinhos[2]	18-34	30-52	21-33
Frango	35	44	21
Porco	40	47	13
Boi	52	45	3
Toucinho	41	47	12
Manteiga[3]	64	33	3
Margarinas[3]			
Cremosas	17	38	45
Duras	18	51	31
Óleos/Gorduras vegetais			
Girassol	11	18	71
Milho	14	26	60
Soja	15	25	60
Algodão	27	20	53
Amendoim	20	48	32
Oliva	16	74	10
Palma (Dendê)	51	39	10
Cacau	62	35	3
Coco	90	8	2

[1]Porcentagem média dos ácidos graxos totais.
[2]Valores mínimos e máximos do conteúdo de ácidos graxos de variedades de peixes das famílias do salmão e do arenque.
[3]A porcentagem média, em relação aos ácidos graxos totais, de ácidos graxos *trans* em manteiga, margarinas de consistência cremosa e margarinas duras é de 3, 15 e 25%, respectivamente.

ga e com maior número de insaturações, como os ácidos eicosapentaenóico (EPA 20:5) e docosaexaenóico (DHA 22:6), são praticamente inexistentes nos óleos vegetais. A fonte mais importante de EPA e DHA são os peixes marinhos, por exemplo, salmão, arenque, atum, sardinha, tainha, cavala etc. Os ácidos graxos ω-3 de cadeia longa são sintetizados pelo fitoplâncton, que constitui a base da cadeia alimentar marinha: os peixes que se alimentam direta ou indiretamente desses organismos contêm um alto teor de EPA e DHA. Ovos, carne de boi, porco e frango podem fazer contribuições significativas, mas bem menores do que peixes, à ingestão de ω-3 de cadeia longa.

Os mamíferos dispõem de todas as enzimas indispensáveis para sintetizar ácidos graxos ω-3 de cadeia longa a partir do ácido graxo essencial ω-3 da dieta, o ácido α-linolênico. A despeito disso, várias evidências indicam que as necessidades de EPA e DHA na infância não podem ser supridas por síntese endógena. Considerando-se, ainda, que estes compostos conferem proteção contra certas moléstias, tem-se recomendado uma maior ingestão dos próprios ácidos graxos de cadeia longa. Mesmo o teor de ácido α-linolênico da dieta é menor do que o desejável. Nos últimos 50 anos, verificou-se uma grande alteração do tipo de gordura consumida em sociedades industrializadas. Houve queda da utilização de gorduras animais, de peixes inclusive, ricas em ω-3, e aumento do emprego de óleos vegetais com alta concentração de ácido linoleico (ω-6), levando a um acréscimo no consumo deste ácido graxo de cerca de 50%. A alta razão ω-6/ω-3 das dietas atuais limita a conversão de α-linolênico em EPA e DHA, devido à competição exercida pelos ácidos graxos ω-6 como substratos das dessaturases que promovem as insaturações dos ácidos graxos ω-3. Ou seja, a ingestão de α-linolênico deveria ser aumentada; todavia, a manipulação da proporção de ácidos graxos ω-6/ω-3 da dieta é, ainda, objeto de polêmica.

As recomendações gerais para a composição de lipídios de uma dieta saudável são: manutenção de baixos teores de lipídios totais (25-30% do conteúdo calórico da dieta) e de gorduras saturadas (no máximo 10% das calorias totais) e diminuição do teor de ω-6, acompanhada por aumento daquele de ω-3 (por meio do consumo de peixes e de óleos vegetais contendo ácido α-linolênico, como soja e canola). O padrão de nutrição dos japoneses segue estas recomendações e parece contribuir, pelo menos em parte, para que a sua expectativa de vida seja a maior do mundo. Dietas vegetarianas, quando comparadas com dietas onívoras, apresentam razões linoleico/α-linolênico mais elevadas e teores mais baixos de ω-3 de cadeia longa, sendo, portanto, menos apropriadas.

A composição de lipídios plasmáticos é influenciada pela composição de lipídios da dieta

Os lipídios presentes na dieta, em especial os ácidos graxos dos triacilgliceróis, exercem forte interferência sobre o teor de colesterol plasmático, o qual se correlaciona diretamente com a incidência de aterosclerose.

Os ácidos graxos insaturados promovem a redução do nível plasmático do LDL-colesterol e de triacilgliceróis. Os ácidos graxos saturados têm efeito oposto. Todavia, quando a substituição dos ácidos graxos saturados é feita por ácidos graxos poliinsaturados do tipo ω-6 (óleos vegetais, em geral), há também uma pequena diminuição do HDL-colesterol; isto não acontece quando há consumo de monoinsaturados. Em resumo, os ácidos graxos saturados elevam o LDL-colesterol; os poliinsaturados ω-6 reduzem o LDL-colesterol e, discretamente, o HDL-colesterol; os monoinsaturados determinam uma composição mais adequada das lipoproteínas plasmáticas, diminuindo a fração LDL sem alterar a fração HDL, que é a fração protetora. Por esta razão, os ácidos graxos monoinsaturados são, atualmente, os mais recomendados.

O azeite de oliva é especialmente rico em triacilgliceróis contendo ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico (18:1 Δ9 ω-9). A recomendação para o consumo de azeite de oliva originou-se da constatação de que ele constitui a maior fonte de gordura utilizada pelas populações da região do Mar Mediterrâneo, que apresentam baixa incidência de aterosclerose. Diversos estudos demonstram que indivíduos com hipercolesterolemia, quando submetidos a dieta com baixo teor de lipídios, mas constituídos principalmente por ácidos graxos monoinsaturados, apresentam queda dos níveis de colesterol plasmático, assim como de triacilgliceróis, com um aumento relativo de HDL-colesterol. Os óleos de soja e canola também são ricos em ácidos graxos monoinsaturados (Tabela 18.9).

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa do tipo ω-3, principalmente EPA e DHA, atuam favoravelmente na prevenção e no tratamento de diversas doenças, particularmente as cardiovasculares. Estes ácidos graxos têm forte ação antitrombótica (a trombose é a maior complicação da aterosclerose) e exercem o efeito hipocolesterolêmico mais apropriado: reduzem a fração LDL e aumentam a fração HDL. O seu consumo acarretaria proteção contra a aterosclerose, o que explicaria os baixos índices de doenças cardiovasculares verificados em algumas populações, como os esquimós e os japoneses.

O desenvolvimento de gorduras industrializadas ocasionou não apenas um maior consumo de ácidos graxos do tipo ω-6, como também de ácidos graxos *trans*. Estes ácidos graxos contêm uma ou mais duplas ligações com configuração *trans*, enquanto os ácidos graxos naturais têm configuração *cis*. As duplas ligações com configuração *trans*, ao contrário

Tabela 18.9 Teor[1] de ácidos graxos de óleos vegetais e de peixe

	Óleos					
	Girassol	Oliva	Milho	Soja	Canola	Peixe marinho[2]
Ácidos graxos						
Saturados	12,1	17,1	14,5	15,5	6,8	34,1
Monoinsaturados						
Oleico	18,6	71,1	27,5	23,4	64,1	14,4
Palmitoleico	0,1	1,2	0,1	0,1	0,2	13,2
Outros[3]	—	—	—	—	1,0	2,1
Total de monoinsaturados	18,7	72,3	27,6	23,5	65,3	29,7
Poliinsaturados						
ω-6						
Linoleico	68,2	10,0	57,0	53,2	18,7	1,2
Araquidônico	—	—	—	—	—	1,1
Outros[3]	—	—	—	—	—	0,5
Total de ω-6	68,2	10,0	57,0	53,2	18,7	2,8
ω-3						
α-linolênico	0,5	0,6	0,9	7,8	9,2	1,0
Eicosapentaenóico (EPA)	—	—	—	—	—	18,1
Docosaexaenóico (DHA)	—	—	—	—	—	8,7
Outros[3]	—	—	—	—	—	2,5
Total de ω-3	0,5	0,6	0,9	7,8	9,2	30,3
Total de poliinsaturados	68,7	10,6	57,9	61,6	27,9	33,1

[1]Porcentagem média dos ácidos graxos totais.
[2]Variedade de peixe da família do arenque.
[3]Ácidos graxos minoritários.

das duplas ligações *cis*, não produzem dobras nas moléculas, que se associam de modo tão compacto quanto os ácidos graxos saturados (Seção 6.2.1). Os ácidos graxos *trans* podem, assim, modificar a viscosidade de membranas, uma característica decisiva para diversas funções a elas associadas. Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que o consumo de ácidos graxos *trans* correlaciona-se com o risco aumentado de doenças coronarianas — eles provocam aumento do LDL-colesterol e redução do HDL-colesterol, um efeito ainda mais adverso do que aquele determinado pelos ácidos graxos saturados. Os ácidos graxos *trans*, obviamente, não apresentam atividade de ácidos graxos essenciais e têm sido implicados em distúrbios do metabolismo dos essenciais, que poderiam afetar o desenvolvimento intra-uterino do feto.

A maior fonte de ácidos graxos *trans* é a *gordura hidrogenada*, também chamada de *gordura vegetal* — 90-95% dos *trans* da dieta são dela derivados. A gordura hidrogenada é obtida pela hidrogenação parcial de óleos vegetais, que eleva o seu ponto de fusão, propiciando uma consistência sólida à temperatura ambiente, e aumenta a sua estabilidade. Na hidrogenação parcial de óleos, há saturação de duplas ligações dos ácidos graxos insaturados e transformação de ligações *cis* em *trans*. Este é o processo utilizado na fabricação de *margarinas e óleos para fritura*. Os ácidos graxos *trans* são, então, encontrados em alimentos industrializados tais como bolachas, bolos, tortas, sorvetes e frituras em geral. Pequenas quantidades de ácidos graxos *trans* são encontradas na natureza, em algumas plantas e em carnes e laticínios derivados de animais ruminantes; nestes animais resultam de fermentação pela microflora do rúmen. A bioidrogenação de ácidos graxos insaturados constitui uma fonte secundária de ácidos graxos *trans* dietéticos.

A quantidade de ácidos graxos *trans* presentes na dieta deve ser a menor possível, já que não há recomendação de sua ingestão. A indicação do conteúdo de ácidos graxos *trans* (gordura *trans*) no rótulo dos produtos alimentícios comercializados, atualmente obrigatória, é fundamental para o controle do consumo desse tipo de gordura.

Os efeitos do teor de colesterol da dieta sobre a sua concentração no plasma têm sido questionados. O colesterol é encontrado em tecidos animais, sendo muito abundante na gema de ovo e miolo (cérebro); é praticamente ausente dos vegetais. Acreditava-se, anteriormente, que uma maior ingestão de produtos animais provocava aumento do colesterol plasmático, como resultado da ingestão aumentada de colesterol. Na realidade, eram os ácidos graxos saturados, abundantes nos produtos animais ricos em gordura, os responsáveis pelo resultado obtido. Realmente, o nível plasmático de colesterol deveria ser pouco influenciado pela quantidade ingerida desta substância, devido à existência de uma

via eficiente de síntese endógena, cuja velocidade é adaptada à quantidade de colesterol ingerido; os seres humanos podem, inclusive, prescindir de colesterol exógeno. No entanto, evidências mais recentes indicam que o colesterol da dieta pode aumentar o nível plasmático de LDL-colesterol, se bem que em proporção muito menor do que os ácidos graxos saturados. Parece que o efeito dos ácidos graxos saturados sobre os níveis de LDL-colesterol é potencializado pela presença concomitante de colesterol na dieta: alimentos ricos em colesterol, mas que têm conteúdo relativamente baixo de ácidos graxos saturados, como os ovos, não alteram o nível plasmático de colesterol.

18.3 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição é o problema nutricional mais comum

As necessidades proteicas do organismo são satisfeitas com a ingestão da dose mínima recomendada de proteínas com altos valores de NPU, característicos das proteínas animais. Entretanto, o custo elevado dos produtos de origem animal é responsável por sua escassez na dieta dos habitantes de países em desenvolvimento, ocasionando a desnutrição proteica crônica. Nestes países, a moléstia é comum na população adulta, mas afeta principalmente as crianças. Os altos índices de mortalidade infantil por infecções respiratórias e gastrointestinais são, na verdade, resultantes da desnutrição, que facilita a instalação e o progresso daquelas moléstias. Um estudo realizado com crianças brasileiras confirma que o fator determinante desta situação é, primordialmente, econômico. A avaliação da altura em relação à idade — um indicador importante do estado nutricional — mostrou que apenas as crianças pertencentes a núcleos familiares com renda acima de cinco salários mínimos apresentavam medidas coincidentes com o padrão internacional (Fig. 18.2). Duas síndromes de desnutrição são muito freqüentes: kwashiorkor e marasmo.

O *kwashiorkor* é a doença do desmame, que afeta o primeiro filho, depois do nascimento do segundo — a palavra *kwashiorkor* significa "segundo filho" em um dialeto africano. A moléstia se manifesta em crianças após a interrupção

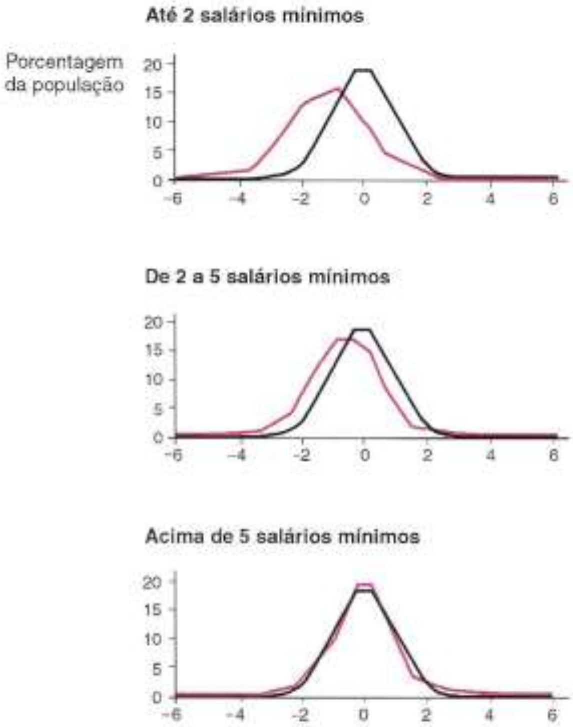


Fig. 18.2 Comparação da altura de crianças brasileiras — de até 10 anos, pertencentes a famílias com diferentes rendas — com o padrão internacional. As curvas em vermelho referem-se às crianças brasileiras e as curvas em preto, ao padrão de altura adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os números nas abscissas indicam diferenças (em cm) em relação à altura padrão. (Reproduzida de Sawaia, A. L. *Desnutrição Urbana no Brasil em um Período de Transição*. Editora Cortez, 1997.)

do aleitamento, quando elas passam a ingerir alimentos contendo principalmente carboidratos, e com teor reduzido de proteínas, que, além do mais, são de baixa qualidade. Caracteriza-se, portanto, como uma desnutrição essencialmente proteica. As crianças afetadas apresentam desenvolvimento retardado, apatia extrema, anorexia, edema (acúmulo de água nos tecidos, resultante da diminuição da osmolaridade plasmática provocada pela baixa concentração de albumina), alterações de pele, cabelos e olhos, lesões hepáticas, queda da resistência a infecções etc. O balanço de nitrogênio é, naturalmente, negativo.

O *marasmo*, ainda mais comum que o kwashiorkor, é causado por deficiência proteica associada à deficiência calórica. Pode ser distinguido do kwashiorkor por uma diminuição ainda mais acentuada de peso, acompanhada por redução extrema da musculatura e ausência de edema. A deficiência generalizada de nutrientes, inclusive carboidratos, resulta em hipoglicemia crônica, que determina uma relação insulina/glucagon baixa. Os processos degradativos são estimulados: as proteínas musculares são consumidas lentamente, levando a um balanço negativo de nitrogênio. A intensa mobilização de proteínas tissulares seria responsável pela manutenção dos níveis séricos de albumina compatíveis com a ausência de edema.

Marasmo e kwashiorkor nem sempre são síndromes inteiramente distinguíveis, pois se encontra toda sorte de condições intermediárias. Além disso, as deficiências proteico-calóricas estão quase sempre associadas a deficiências de vitaminas e minerais, agravando o quadro.

18.4 MICRONUTRIENTES

Vitaminas e íons inorgânicos são fatores essenciais da dieta

Além dos macronutrientes — carboidratos, lipídios e proteínas — os seres humanos dependem da ingestão de pequenas quantidades de vitaminas e íons inorgânicos, conjuntamente denominados *micronutrientes*.

As vitaminas não são estocadas em níveis apreciáveis, devendo, portanto, ser supridas continuamente pela dieta. São classificadas em dois grandes grupos, segundo suas características de solubilidade.

As *vitaminas hidrossolúveis* incluem as vitaminas do complexo B (Tabela 5.13, Seção 5.9) e a vitamina C; são componentes de coenzimas, cuja atuação nas reações do metabolismo tem sido analisada ao longo deste texto. Eventuais excessos de vitaminas hidrossolúveis são excretados na urina e raramente provocam efeitos colaterais.

As *vitaminas lipossolúveis* — *A, D, E* e *K* — são eliminadas mais lentamente e a ingestão aumentada pode ocasionar efeitos danosos, particularmente no caso das vitaminas A e D. Ao contrário das hidrossolúveis, apresentam uma semelhança estrutural, por serem derivadas do isopreno. Ocorrem em alimentos de origem vegetal, incluindo óleos, ou alimentos animais ricos em gordura; são absorvidas no intestino delgado juntamente com os lipídios e, como estes, incorporadas em quilomícrons. Estão implicadas em processos fisiológicos bastante variados. A vitamina K, por exemplo, participa como cofator de reações de carboxilação de resíduos de glutamato de várias proteínas, dentre as quais os fatores responsáveis pela coagulação sangüínea. A vitamina A, obtida principalmente a partir de carotenóides vegetais, está envolvida nas reações da visão e no crescimento e diferenciação celular; devido a esta última ação, o ácido retinóico, uma das formas da vitamina A, tem sido utilizado para estimular a renovação da epiderme. Compostos precursores da vitamina D, presentes nos alimentos ou na pele de animais (como o 7-deidrocolesterol, um derivado do colesterol), são convertidos por radiação ultravioleta em formas inativas da vitamina, que, após sofrerem modificações enzimáticas no fígado e rim, passam a exibir atividade de hormônios reguladores do metabolismo de cálcio e fosfato.

A vitamina E localiza-se, predominantemente, na bicamada lipídica de membranas celulares e na monocamada lipídica de lipoproteínas plasmáticas. Sua função principal é evitar que os ácidos graxos insaturados constituintes dessas estruturas sejam oxidados por radicais livres. Além da vitamina E, os carotenóides e as vitaminas A e C também agem como antioxidantes, bloqueando a ação lesiva de radicais livres sobre as estruturas celulares. Estudos populacionais têm mostrado uma correlação significativa entre a incidência de câncer e doenças cardiovasculares e o baixo consumo de vitaminas antioxidantes e selênio. Por enquanto, não existe uma indicação explícita de suplementação de antioxidantes, recomendando-se, apenas, a ingestão de alimentos que os contenham em níveis significativos.

Os íons, também chamados de *nutrientes inorgânicos* ou *minerais*, além de atuarem como cofatores enzimáticos, participam de inúmeros processos importantes; são responsáveis, ainda, pela dureza de certas estruturas, como ossos e dentes. O número de minerais que são indispensáveis para a manutenção de um estado saudável é muito grande. Alguns, como Ca^{2+}, fosfato, Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} etc., são necessários em quantidades da ordem de miligramas ou gramas, enquanto, para outros, bastam algumas dezenas de microgramas. Dentre estes, encontra-se o selênio, que é cofator de diversas enzimas, por exemplo, a glutationa peroxidase, responsável pela dissipação de peróxidos; assim, o selênio, além das vitaminas citadas, participa do sistema antioxidante do organismo.

BIBLIOGRAFIA

Benoit SC et al.: Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res* **59**:267-285, 2004.

Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients), 2005. Food and Nutrition Board (U.S.) and Health Canada. http://fermat.nap.edu/catalog/10490.html#toc

Elias SL, Innis SM: Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am J Clin Nutr* **73** (4): 807-814, 2001.

Fat, Trans Fatty Acid (Trans Fat), and Cholesterol, 2006 — U.S. Department of Health and Human Services — Food and Drug Administration (FDA) — Center for Food Safety & Applied Nutrition. http://www.cfsan.fda.gov/~dms/qatrans2.html.

Garrow JS et al: *Human Nutrition and Dietetics*, 10th ed. Churchill Livingstone, 2001.

Guerre-Millo M: Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest* **25** (10):855-861, 2002.

Krauss RM et al: AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* **102** (18):2284-2299, 2000.

Lemaitre RN et al: Cell membrane trans-fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Circulation* **105** (6):697-701, 2002.

Lin YJ et al: Molecular and genetics mechanisms of obesity: implications for future management. *Curr Mol Med* **3** (4):325-340, 2003.

Mahan LK, Escott-Stump S (editors): *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*, 10th ed. W. B. Saunders Company, 2000.

Marlett JA et al: Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* **102** (7):993-1000, 2002.

Moreno JJ, Mitjavila MT: The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis. *J Nutr Biochem* **14**:182-195, 2003.

National Nutrient Database for Standard Reference, 2005 — U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA). http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl

Nutrient Value of Some Common Foods, 1999 — Nutrition Research Division — Health Protection Branch — Health Canada. http://www.hc-sc.gc.ca/

Pellet PL: Protein requirements in humans. *Am J Clin Nutr* **51**:723-737, 1990.

Proceedings of the International Conference on Highly Unsatured Fatty Acids in Nutrition and Disease Prevention. *Am J Clin Nutr* **71** (Suppl):169S-398S, 2000.

Sowers JR: Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med* **115** (Suppl 8A):37S-41S, 2003.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2004 — Faculdade de Ciências Farmacêuticas — USP. http://www.fcf.usp.br/tabela/

Tabela de Composição de Alimentos da América Latina, 2004 — Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO-UN). http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/default.htm

PARTE 4

REGULAÇÃO DO METABOLISMO

19

Estratégias de Regulação do Metabolismo

A estabilidade da massa corpórea e do aspecto geral de um indivíduo adulto e sadio esconde as grandes flutuações diárias de seu metabolismo. De fato, a ingestão periódica de alimentos submete o organismo humano a situações opostas que se alternam: abundância e escassez de nutrientes. A adaptação a esta alternância deriva de sistemas reguladores capazes não só de reconhecer a situação nutricional vigente, como também de responder apropriadamente a ela. Após uma refeição, as moléculas absorvidas são convertidas em estoques de energia, necessários para serem utilizados nos períodos de jejum, além de seguirem outros destinos metabólicos. A glicose, por exemplo, poderá ser oxidada a CO_2 e H_2O, mas poderá também gerar o esqueleto de carbono de aminoácidos não-essenciais, ser polimerizada a glicogênio ou ser convertida a gordura.

As vias metabólicas não funcionam sempre com a mesma velocidade. Ao contrário, cada via será acionada com intensidade variada, dependendo da situação fisiológica considerada, que se refere não apenas a estados nutricionais diferentes, mas, também, a demandas energéticas diferentes, como no repouso ou sob exercício vigoroso. O ajuste do metabolismo às diferentes condições fisiológicas é obtido graças a processos que, em conjunto, são chamados de *regulação metabólica*. Os eventos de regulação não são isolados; cada um deles atua como um gerador primário de sinais, captados por geradores secundários, capazes de retransmiti-los até atingir toda a rede metabólica e repercutir, a distância, em outros órgãos. A complexidade do processo é enorme, mas justifica-se por permitir um ajuste sensibilíssimo do metabolismo a diferentes situações, propiciando uma resposta pronta e logicamente organizada.

Diante desta complexidade, ***o estudo da regulação metabólica será feito em três etapas***. Neste capítulo serão analisadas ***as estratégias*** de que o organismo dispõe para regular o metabolismo; no próximo capítulo será apresentada ***a regulação, em separado, de cada via metabólica***; no Capítulo 21, os dados recolhidos em cada uma das vias serão combinados para descrever ***a regulação metabólica integrada***, frente a situações escolhidas como exemplos. Esta descrição compreenderá o metabolismo de alguns órgãos e a influência dos hormônios considerados mais relevantes. Finalmente, no Capítulo 22 serão analisadas as fontes de energia utilizadas pelo organismo para o exercício e o ajuste do metabolismo a esta situação.

Fundamentalmente, a regulação metabólica é feita por interferência direta em determinadas reações químicas que compõem o metabolismo, aumentando ou diminuindo sua velocidade. O resultado imediato desta alteração de velocidade é o aumento da oferta de substratos para as reações subseqüentes ou o acúmulo de metabólitos, o que, indiretamente, irá afetar outras reações relacionadas. Assim, o efeito é propagado para todas as vias metabólicas.

As formas mais decisivas de interferir na velocidade de uma reação catalisada são, naturalmente, alterar a *concentração* ou a *eficiência* do seu catalisador.

19.1 ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS

No caso das reações biológicas, o catalisador — a enzima — é produzido pelas próprias células e sua concentração pode ser alterada por variação na velocidade de sua síntese ou na velocidade de sua degradação. Este é um mecanismo de regulação a longo prazo, manifestando-se em tempos da ordem de horas ou dias. O controle da síntese de enzimas é exercido, basicamente, sobre a transcrição do gene que codifica a enzima: pode ser ativada ou inibida, levando à indução ou à repressão da síntese da enzima, respectivamente. A regulação da transcrição gênica é complexa, podendo ser exercida por fatores que vão desde a concentração do substrato sobre o qual a enzima atua, até hormônios específicos. Por exemplo, uma dieta rica em carboidratos provoca aumento da expressão de genes que codificam determinadas enzimas da glicólise. Estas alterações, em alguns casos, resultam de interação da própria glicose com seqüências reguladoras dos promotores dos genes e, em outros, são devidas à atuação de efetores ativados na via de sinalização da insulina (Seção 19.4), cuja secreção é estimulada por glicose.

A velocidade de degradação de uma enzima também sofre controle rigoroso, embora pouco conhecido. Enzimas diferentes têm tempos de permanência diferentes nas células, ou seja, têm meias-vidas diferentes (Tabela 17.1, Seção 17.1). Em geral, as enzimas que catalisam reações-chave do metabolismo têm tempos curtos de vida.

Esta contínua síntese e degradação proteica deve ser entendida como um processo de adaptação do metabolismo que permite drenar o fluxo metabólico em uma ou outra direção, de acordo com as condições fisiológicas prevalecentes no momento. Tais desvios seriam dificultados se a concentração das enzimas permanecesse constante em qualquer condição.

Ao longo dos capítulos subseqüentes, serão apresentados muitos exemplos de alterações do conteúdo celular de enzimas, que constituem respostas do organismo a situações fisiológicas diversas. A Tabela 21.1 (Seção 21.1) contém um resumo de enzimas importantes cuja síntese é passível de indução.

19.2 ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS

Além da alteração na concentração da enzima, existe um outro nível de regulação, que se manifesta a curto prazo, em tempos da ordem de segundos ou minutos: a velocidade da reação catalisada pode ser aumentada ou diminuída. Mesmo quando a concentração de uma enzima é mantida constante, a velocidade da reação que ela catalisa pode variar como resultado de mudanças conformacionais da própria enzima, provocadas por ligação de compostos ou grupos à cadeia polipeptídica. Esta ligação pode ser do tipo não-covalente (*regulação alostérica*) ou do tipo covalente (*regulação por modificação covalente*). A regulação alostérica da atividade das enzimas depende da concentração celular de determinados compostos que são claros indicadores das condições metabólicas da célula. A regulação por modificação covalente está sob influência indireta da ação hormonal, que coordena a resposta do organismo como um todo. O alvo destas regulações são certas enzimas-chave presentes nas vias metabólicas, as *enzimas reguladoras*, cuja atividade é decisiva para o funcionamento de toda a via.

As regulações alostérica e por modificação covalente terão seus princípios gerais descritos a seguir.

19.2.1 REGULAÇÃO ALOSTÉRICA

As enzimas reguladas por modificação não-covalente são chamadas *alostéricas*. Este tipo de enzima é encontrado em quase todas as vias metabólicas, catalisando geralmente uma reação irreversível localizada no início da via. Estruturalmente, são proteínas oligoméricas, compostas de várias cadeias polipeptídicas, cada uma com um sítio ativo. A ligação do substrato ao sítio ativo de uma subunidade afeta a conformação das demais, facilitando a ligação das moléculas de substrato aos outros sítios ativos. A cooperatividade estabelecida entre os sítios catalíticos é evidenciada pela cinética da catálise: o gráfico de velocidade da reação contra a concentração de substrato é uma *curva sigmóide*, ao invés da *curva hiperbólica* de Michaelis-Menten (Fig. 19.1 a). Trata-se do mesmo tipo de cooperatividade encontrada na ligação do oxigênio à hemoglobina, também uma proteína oligomérica, com um sítio de ligação para o oxigênio, o grupo heme, em cada subunidade. Em contraposição, a ligação do oxigênio à mioglobina é feita segundo uma cinética hiperbólica, como a das enzimas michaelianas. Estas enzimas apresentam, geralmente, uma única cadeia polipeptídica, com um só sítio ativo, assim como a mioglobina, que tem apenas uma cadeia polipeptídica, com um único grupo heme. Mesmo enzimas oligoméricas podem apresentar cinética michaeliana, desde que não exista efeito cooperativo entre suas subunidades.

As enzimas alostéricas são sensíveis reguladores do metabolismo graças à possibilidade de ligarem-se a determinados metabólitos, o que provoca grandes alterações de sua atividade. Estes metabólitos, os *efetuadores* ou *moduladores alostéricos*, são chamados *positivos* (*ativadores alostéricos*) ou *negativos* (*inibidores alostéricos*), segundo provoquem aumento

ou redução da velocidade da reação catalisada (Fig. 19.1 b). Um efetuador alostérico liga-se a um nicho específico da estrutura tridimensional da enzima, chamado *centro* ou *sítio alostérico*, que é tão específico para o efetuador quanto o sítio ativo é para o substrato.

As enzimas alostéricas caracterizam-se por apresentarem duas conformações espaciais diferentes e interconversíveis, com alta ou baixa afinidade pelo substrato. O efeito dos efetuadores alostéricos pode ser explicado por sua ligação preferencial a uma das formas, muito ativa ou pouco ativa, da enzima. Como esta ligação estabiliza a enzima em uma dada forma, os efetuadores alostéricos atuam como ativadores ou inibidores da reação enzimática.

A ligação dos efetuadores à enzima é não-covalente e reversível, e, portanto, o percentual de enzima que se encontra na forma ativa ou inativa depende da concentração do efetuador alostérico. Considere-se o esquema simplificado de ligação de uma enzima alostérica a seu efetuador:

$$\underset{\text{forma ativa}}{\boxed{\text{Enzima}}} + \text{Efetuador alostérico negativo} \rightleftharpoons \underset{\text{forma inativa}}{\boxed{\text{Enzima} - \text{Efetuador alostérico negativo}}}$$

Em uma determinada situação fisiológica, se a concentração do efetuador alostérico negativo for baixa, praticamente todas as moléculas de enzima estarão ativas; à medida que a concentração do efetuador aumenta, percentuais crescentes de enzima estarão a ele ligadas e, portanto, inativas. Quando o inibidor alostérico, que é um produto do metabolismo, for consumido por outra reação celular e sua concentração decrescer, percentuais cada vez maiores de enzima voltarão à forma ativa.

Uma mesma enzima alostérica pode ser regulada por efetuadores alostéricos positivos e negativos, que poderão estar presentes em diferentes concentrações. A velocidade da reação que ela catalisa poderá variar em uma larga faixa: a menor velocidade será obtida na presença de concentrações altas do efetuador negativo, e a maior velocidade, na presença de grandes concentrações do efetuador positivo. Desta forma, *para uma mesma concentração de substrato e mesma concentração de enzima*, a velocidade da reação catalisada por uma enzima alostérica pode apresentar grande variação; note-se, na Fig. 19.1 b, os valores diferentes de velocidade (v_1, v_2, v_3), obtidos com a concentração S_1 de substrato.

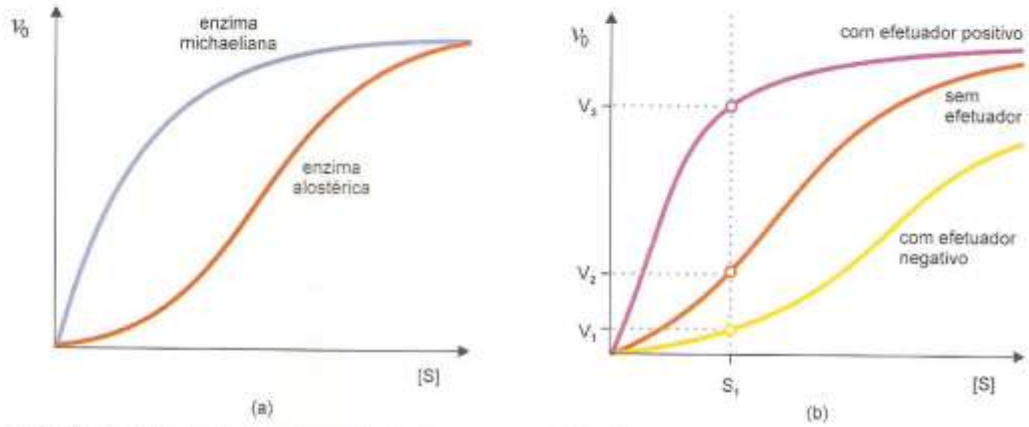


Fig. 19.1 a) Gráfico da velocidade de reação em função da concentração de substrato para uma enzima alostérica e para uma enzima michaeliana. A curva sigmoidal exibida pela enzima alostérica é o reflexo da cooperatividade apresentada pelas suas subunidades; as enzimas monoméricas, michaelianas, têm cinética hiperbólica. b) Cinética da reação catalisada por uma enzima alostérica na presença e na ausência de efetuadores alostéricos. Com igual concentração de substrato (S_1), a velocidade da reação varia dependendo da presença de efetuadores.

Nas vias metabólicas é freqüente que o produto final atue como efetuador alostérico negativo de uma enzima alostérica que catalisa uma das primeiras reações da via (Fig. 19.2). Quando aumenta a concentração celular deste produto, sua atuação como inibidor alostérico faz diminuir a velocidade da via, restringindo sua própria produção. Este é o mecanismo conhecido como *inibição por feedback* ou *retroinibição*. À medida que o metabólito é consumido por outras seqüências metabólicas e sua concentração diminui, percentuais crescentes de enzima voltam à forma ativa, aumen-

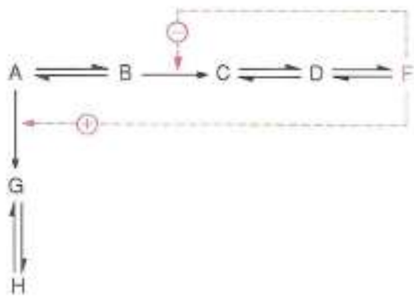


Fig. 19.2 Regulação alostérica de duas vias metabólicas hipotéticas. O composto F é efetuador alostérico negativo da enzima que catalisa a conversão de B em C e efetuador alostérico positivo da enzima que converte A em G — a oferta de A resulta em síntese aumentada de H.

tando a velocidade da via. Note-se que a participação da enzima reguladora em uma etapa inicial da via é estratégica, constituindo um fator de economia celular, ao impedir o acúmulo indevido de compostos intermediários que poderiam interferir de modo negativo sobre outras vias. Muitas vezes, o produto final de uma via atua também como efetuador alostérico positivo em uma outra via metabólica que utiliza o mesmo substrato inicial. Naturalmente, a regulação desta segunda via irá interferir em uma terceira via, e assim por diante. O resultado final desta série de interferências é o rigoroso ajuste da produção de cada composto ao seu consumo e o funcionamento harmônico e coordenado das reações que compõem o metabolismo.

As coenzimas são efetuadores alostéricos importantes

A função de modulador alostérico não é exercida apenas por compostos intermediários do metabolismo — é muito freqüente que coenzimas também desempenhem este papel, ligando-se ao sítio alostérico. Uma coenzima pode participar de uma reação exercendo seu papel precípuo de coenzima, ligando-se ao sítio ativo da enzima; a mesma coenzima pode atuar como efetuador alostérico de outra enzima, ligando-se, neste caso, ao sítio alostérico e alterando a velocidade da reação. Casos mais complexos ocorrem quando a coenzima de uma reação atua como inibidor alostérico da mesma enzima, sendo, portanto, reconhecida tanto pelo sítio ativo como pelo sítio alostérico. O exemplo clássico é o ATP na reação catalisada pela fosfofrutoquinase 1. Este caso constitui um aparente paradoxo, pois a ligação da coenzima ao sítio alostérico impediria sua ligação ao sítio ativo, inviabilizando a reação. Na realidade, a afinidade da coenzima pelo sítio ativo é muito maior do que pelo sítio alostérico. Em baixas concentrações da coenzima, a ligação com o sítio ativo é favorecida; em altas concentrações, a ligação com o sítio alostérico torna-se possível e a reação passa a ser inibida.

A Tabela 19.1 alista as enzimas alostéricas mais relevantes, bem como seus principais efetuadores positivos e negativos.

Tabela 19.1 Enzimas alostéricas importantes e seus efetuadores

Enzima	Efetuadores alostéricos	
	Negativos	Positivos
Fosfofrutoquinase 1	ATP, Citrato	AMP, Frutose 2,6-bisfosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 2,6-bisfosfato	
6-Fosfofruto-2-quinase	Fosfoenolpiruvato	
Frutose 2,6-bisfosfatase	Frutose 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato
Piruvato quinase	Alanina	Frutose 1,6-bisfosfato
Piruvato carboxilase		Acetil-CoA
Piruvato desidrogenase	Acetil-CoA, NADH	Piruvato
Isocitrato desidrogenase	NADH	ADP
α-Cetoglutarato desidrogenase	Succinil-CoA, NADH, ATP	
Carnitina acil transferase I	Malonil-CoA	
Citrato liase	Acil-CoA	
Acetil-CoA carboxilase	Acil-CoA	Citrato

As coenzimas, mesmo quando não agem como efetuadores alostéricos, podem determinar a velocidade das reações das quais participam em função de sua concentração. Em cada reação a coenzima é utilizada em quantidade estequiometricamente equivalente à do substrato e, como as concentrações celulares das coenzimas são muito inferiores às dos substratos, elas são limitantes da velocidade da reação. A ação contínua das coenzimas é viabilizada pelo fato de oscilarem constantemente entre suas duas formas possíveis: NAD^+ e NADH, ATP e ADP etc. As mesmas coenzimas participam de vias metabólicas diferentes, algumas das quais consomem a forma oxidada da coenzima, e outras, a forma reduzida. É o caso do ciclo de Krebs, que utiliza a forma oxidada de NAD^+ e FAD e produz as respectivas formas reduzidas; em contrapartida, a cadeia de transporte de elétrons recebe as coenzimas reduzidas e oxida-as. Estas vias podem, então, trabalhar em associação utilizando uma pequena quantidade absoluta de coenzimas, reciclando-as permanentemente. É também o que ocorre com a via das pentoses fosfato e a síntese de ácidos graxos. O NADPH, a forma predominante da coenzima no citossol, inibe as desidrogenases da via das pentoses fosfato; assim, somente quando processos de sínteses redutoras, como a síntese de ácidos graxos, fazem diminuir a concentração citossólica de NADPH e aumentar a de $NADP^+$, as desidrogenases e, por conseqüência, a via das pentoses podem funcionar.

Tendo em vista que a soma das concentrações celulares das duas formas de uma coenzima — (NAD^+ + NADH), (ATP + ADP) etc. — é constante, o aumento da concentração de uma das formas é sempre acompanhado pela diminuição da outra forma. Adicionalmente, a proporção entre as duas formas varia com o compartimento celular.

As coenzimas constituem indicadores sensíveis da fisiologia celular, e pequenas alterações na concentração de uma de suas formas são imediatamente percebidas pelas reações que se processam naquele compartimento celular e, subseqüentemente, pelos ciclos metabólicos de outros compartimentos. Quando, por exemplo, a fibra muscular executa contração intensa, com um aporte insuficiente de oxigênio, o aumento da concentração mitocondrial de NADH é refletido no citossol, desviando a reação catalisada pela lactato desidrogenase no sentido da formação de lactato, regenerando NAD^+.

A localização intracelular aprimora o controle da atividade de enzimas

A existência de organelas nas células eucarióticas propicia uma forma adicional de controle enzimático. Uma enzima pode ser expressa em dois compartimentos celulares diferentes e ser deslocada de um para o outro, segundo o estado fisiológico vigente, como acontece com a glicoquinase (Seção 20.2).

As organelas provêem microambientes diferenciados nos quais as concentrações de substratos ou efetuadores alostéricos podem ser mais estritamente reguladas, por meio do controle de suas transferências através de membranas.

19.2.2 REGULAÇÃO POR MODIFICAÇÃO COVALENTE

A atividade de uma enzima pode ser drasticamente alterada pela ligação covalente de certos grupos à cadeia polipeptídica, que causa modificações importantes em sua conformação. A alteração de atividade pode ser decorrente de mudanças na afinidade pelo substrato ou na sensibilidade a efetuadores alostéricos.

A modificação covalente constitui uma reação química — ao contrário da ligação não-covalente de efetuadores alostéricos — e é, portanto, catalisada por enzimas. A mudança de atividade não é definitiva, pois este sistema de controle também inclui enzimas capazes de catalisar a retirada do grupo adicionado, devolvendo a enzima modificada à sua conformação original. Várias são as modificações possíveis (metilação, adenilação, acetilação etc.), porém a mais freqüente consiste na fosforilação da cadeia polipeptídica.

A fosforilação é catalisada por *proteína quinases*, que transferem o grupo fosfato terminal do ATP para resíduos específicos de serina, treonina ou tirosina, formando uma ligação éster fosfórico:

$$\text{Proteína}-\text{OH} \ + \ \text{ATP} \longrightarrow \text{Proteína}-\text{O}-\text{Ⓟ} \ + \ \text{ADP} \ + \ H^+$$

Em cada tecido há determinadas proteínas que são substratos das proteína quinases. A fosforilação pode transformá-las de inativas em ativas, ou vice-versa (Tabela 19.2). As próprias proteína quinases estão sujeitas a regulação, podendo ser ativadas por mecanismos diversos, mediados por AMP cíclico, fosfolipídios, íons Ca^{2+} etc. As proteína quinases são classificadas em famílias, cuja nomenclatura habitual baseia-se no agente modulador de sua atividade.

A retirada do grupo fosfato, introduzido pela ação das proteína quinases, é catalisada pelas *fosfoproteína fosfatases*, por hidrólise:

$$\text{Proteína}-\text{O}-\text{Ⓟ} \ + \ H_2O \longrightarrow \text{Proteína}-\text{OH} \ + \ P_i$$

O controle da atuação das fosfoproteína fosfatases (designadas 1, 2 etc.) é menos conhecido do que o das proteína quinases.

Tabela 19.2 Modificação da atividade enzimática por fosforilação

Via metabólica	Enzima fosforilada	Forma
Glicogenólise	Glicogênio fosforilase quinase	Ativa
	Glicogênio fosforilase	Ativa
Glicogênese	Glicogênio sintase	Inativa
Glicólise e gliconeogênese	6-Fosfofruto-2-quinase	Inativa
	Frutose 2,6-bisfosfatase	Ativa
	Piruvato quinase	Inativa
Piruvato → Acetil-CoA	Piruvato desidrogenase	Inativa
Lipólise	Lipase	Ativa
Lipogênese	Citrato liase	Inativa
	Acetil-CoA carboxilase	Inativa
	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase	Inativa

A predominância de uma das formas — fosforilada ou desfosforilada — de uma dada proteína dependerá, portanto, da enzima que estiver ativada: proteína quinase ou fosfoproteína fosfatase. Exemplos destas possibilidades serão mostrados neste e no próximo capítulo.

Nos animais superiores, o mecanismo de regulação por modificação covalente está intimamente associado à ação hormonal.

19.3 AÇÃO HORMONAL

Os mamíferos têm seu metabolismo regulado de forma global e integrada. Nestes organismos, há uma especialização de funções, distribuídas pelos diferentes órgãos ou tecidos, como conseqüência da diferenciação celular. Os mecanismos de regulação metabólica incidem, portanto, sobre o conjunto de enzimas sintetizadas em um órgão, atribuindo a ele capacidades metabólicas específicas. Por exemplo, os hepatócitos são capazes de sintetizar e degradar lipídios; as fibras musculares apenas degradam estes compostos, e hemácias nem sintetizam nem degradam lipídios. Embora desempenhando papéis específicos, os tecidos não são autônomos, devendo agir de forma concertada. A coordenação das respostas dos diversos órgãos e tecidos ao mesmo sinal permite a reação adequada do organismo como um todo e é obtida pela ação de *hormônios*. Os hormônios atuam sobre tecidos específicos, provocando respostas também específicas, mas o conjunto das respostas é cooperativo, tornando lógico e harmônico o ajuste do organismo a uma determinada condição fisiológica.

A interferência hormonal sobre a velocidade das reações do metabolismo depende do hormônio e do tecido considerados e é exercida, como foi assinalado, em dois níveis principais: expressão gênica e atividade enzimática.

Os hormônios são os primeiros mensageiros do sistema endócrino

Os hormônios são compostos sintetizados pelo sistema endócrino e secretados na corrente sangüínea. Ao atingirem células sensíveis — *células-alvo* —, provocam modificações de seu metabolismo por interferência na atividade de enzimas, no controle da expressão gênica ou no transporte através de membranas. São, portanto, os *primeiros mensageiros* químicos, extracelulares, do sistema endócrino, que, juntamente com o sistema nervoso, constituem os sistemas responsáveis pela integração das funções vitais nos animais.

Alguns tipos importantes de hormônios são os *esteróides* (cortisol, aldosterona, estradiol, progesterona, testosterona), os *tireoidianos* (tiroxina, triiodotironina), os *peptídicos* (insulina, glucagon) e as *catecolaminas* (epinefrina, norepinefrina).

Os receptores hormonais situam-se na membrana plasmática, no citossol ou no núcleo das células-alvo

A ação hormonal é iniciada pela interação do hormônio com receptores específicos presentes nas células-alvo. A localização dos receptores varia com o tipo de hormônio, podendo situar-se na membrana plasmática, no citossol ou no núcleo das células. Os receptores são proteínas, capazes de ligarem-se aos hormônios com grande afinidade: os efeitos

dos hormônios são verificados com concentrações plasmáticas menores do que 10^{-10} M. Por serem secretados no plasma, os hormônios são distribuídos por todo o organismo, e é a presença do receptor que torna uma célula responsiva ao hormônio.

Os receptores de diversos hormônios esteróides são proteínas presentes no citossol das células-alvo. O caráter hidrofóbico destes hormônios permite sua rápida difusão pela membrana plasmática, propiciando sua ligação aos receptores. Os complexos hormônio-receptor deslocam-se para o núcleo e fixam-se a seqüências específicas do DNA. Os hormônios tireoidianos agem de modo semelhante, mas têm seus receptores no núcleo. Estes dois tipos de hormônios atuam, portanto, no nível da expressão gênica, alterando a velocidade de transcrição de determinados genes: geralmente, ocorre a ativação da transcrição gênica, com a conseqüente produção de proteínas. A resposta do tecido ao estímulo hormonal é resultado da ação destas proteínas.

Os receptores dos hormônios peptídicos e das catecolaminas situam-se na membrana plasmática. Assim sendo, estes hormônios não penetram nas células — a formação do complexo hormônio-receptor inicia, na membrana, uma seqüência de eventos que leva à produção intracelular de um *segundo mensageiro* da ação hormonal. A atuação deste segundo mensageiro químico sobre as reações processadas na célula-alvo resulta na resposta característica de um dado tecido a um determinado hormônio, sem que este tenha sido introduzido na célula.

A quantidade de receptores presentes nas células varia em função da concentração do hormônio circulante. Existem diversos processos reguladores responsáveis por este ajuste, sendo que, mais freqüentemente, ocorre uma diminuição do número de receptores em resposta a níveis altos do hormônio. Certos hormônios unem-se a receptores localizados na membrana plasmática, provocando a manifestação celular, e, posteriormente, os complexos hormônio-receptor são internalizados por endocitose adsortiva. As vesículas contendo os complexos fundem-se com lisossomos, onde o hormônio é dissociado do receptor e degradado; uma parte dos receptores também é degradada e outra parte é reciclada para a membrana. A junção do hormônio ao receptor determina, portanto, uma diminuição transitória do número de receptores presentes na membrana celular. Cessado o estímulo hormonal, o número de receptores é restabelecido por síntese proteica.

A produção do segundo mensageiro da ação hormonal é uma etapa do processo de transdução de sinal

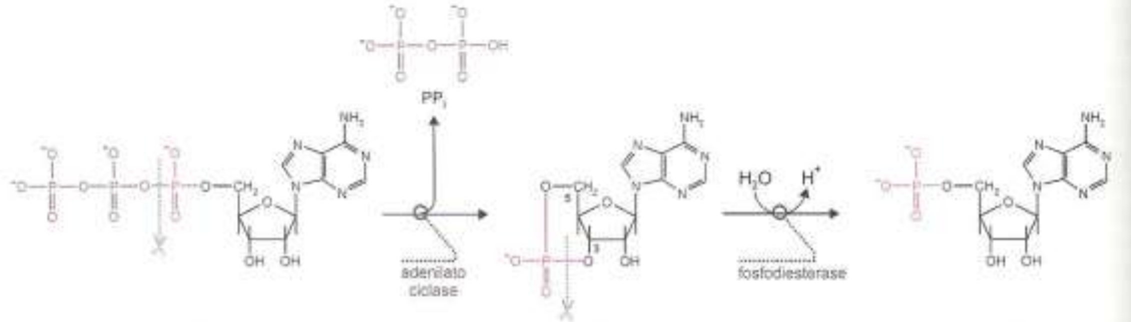
O mecanismo pelo qual os hormônios interagem com as células para efetuar mudanças nos processos intracelulares é chamado *transdução de sinal*. A transdução de sinal inicia-se com a ligação do hormônio a seu receptor na membrana plasmática e prossegue, geralmente, com o acoplamento do complexo hormônio-receptor a uma proteína G, seguido pela interação desta proteína com uma enzima, que, então, catalisa a produção do segundo mensageiro. As *proteínas G* compõem uma grande família de proteínas transdutoras, capazes de transformar sinais moleculares externos em sinais intracelulares.

Os segundos mensageiros de hormônios constituem uma classe de compostos agrupados não pela estrutura química, mas pela função. Alguns exemplos importantes são: AMP cíclico, íons Ca^{2+} e derivados de fosfolipídios de membrana.

O *AMP cíclico (cAMP)*, ou *adenosina 3',5'-monofosfato*, é o segundo mensageiro mais bem conhecido. Este nucleotídio é formado a partir de ATP por ação da *adenilato ciclase*, uma enzima integrada na membrana plasmática. A presença de cAMP nas células irá provocar alterações na atividade de determinadas enzimas e, por conseqüência, no metabolismo. Estas modificações são temporárias, porque o cAMP pode ser hidrolisado a 5'-AMP por uma reação catalisada pela *fosfodiesterase* (Fig. 19.3). A concentração de cAMP e, portanto, a resposta celular ao hormônio está na dependência das atividades relativas da adenilato ciclase e da fosfodiesterase.

A transdução de sinal dos hormônios que utilizam cAMP como segundo mensageiro é efetuada por três proteínas presentes na membrana plasmática: o receptor hormonal, a adenilato ciclase e uma proteína G, que conecta as duas primeiras. As proteínas G são assim designadas pela propriedade de ligarem-se a nucleotídios de guanina, GDP e GTP. São compostas de três subunidades, α, β e γ, e é a subunidade α que tem a capacidade de associação a GDP ou GTP: na ausência do hormônio está ligada a GDP e na presença dele, a GTP. Os eventos (Fig. 19.4 a) que levam à produção de cAMP a partir do estímulo hormonal são:

1. Na ausência do hormônio, a proteína G apresenta-se com as subunidades α-β-γ associadas e a subunidade α unida a GDP; a adenilato ciclase está inativa.
2. Quando o hormônio se liga ao receptor, este sofre uma mudança de conformação, que provoca sua ligação à proteína G. Esta união altera a estrutura da proteína G, fazendo diminuir a afinidade da subunidade α por GDP e aumentar a sua afinidade por GTP; em conseqüência, o GDP é trocado por GTP.



ATP cAMP 5'-AMP

Fig. 19.3 Síntese e hidrólise de cAMP. A adenilato ciclase catalisa a conversão de ATP em cAMP, por formação de uma ligação fosfodiéster entre os carbonos 3' e 5' da ribose e liberação de pirofosfato (PP_i). A ligação é hidrolisada pela fosfodiesterase, originando 5'-AMP.

3. A ligação de GTP à subunidade α promove sua dissociação das outras duas subunidades da proteína G, obtendo-se dois conjuntos: β-γ e α-GTP. Este último associa-se à adenilato ciclase, formando o complexo α-GTP-adenilato ciclase. A ligação de α-GTP estimula a enzima, que catalisa a conversão de ATP em cAMP.

A estimulação da adenilato ciclase tem duração limitada. A própria subunidade α da proteína G tem uma discreta atividade GTPásica, sendo capaz de catalisar a hidrólise lenta de GTP a GDP. Quando isto acontece, há dissociação do complexo α-GDP-adenilato ciclase: a enzima, inativa, é liberada e a subunidade α volta a associar-se às subunidades β-γ, reconstituindo a proteína G, que pode participar de um outro ciclo de transdução de sinal. Em virtude da ação GTPásica da subunidade α, a atividade da adenilato ciclase depende estritamente de estimulação hormonal, cessando na ausência do hormônio.

O mecanismo descrito refere-se à ação de hormônios que *ativam* a adenilato ciclase. Outros hormônios determinam *inibição* da adenilato ciclase: são reconhecidos por um outro tipo de receptor, que se liga a um outro tipo de proteína G, embora o processo que produz a inibição seja análogo ao do estímulo. Ou seja, existem dois tipos de proteínas G: o primeiro deles, designado G_S, com subunidade α chamada α_S (*s* de *stimulation*), está associado a receptores de hormônios que provocam o estímulo da adenilato ciclase, denominados R_S (Fig. 19.4 b). O segundo tipo é chamado G_i, com subunidade α indicada por α_i (*i* de *inhibition*), e intermedeia a ação de hormônios que levam à inibição da adenilato ciclase. Após a ligação desta categoria de hormônio a seu receptor, do tipo R_i, os eventos são semelhantes ao caso do estímulo: troca de GDP por GTP e ligação de α_i-GTP à adenilato ciclase. Esta ligação, entretanto, provoca inibição da enzima. Alguns hormônios, como a epinefrina, podem ligar-se, em tecidos diferentes, a receptores R_S ou R_i.

A atividade GTPásica da subunidade α_S de um sistema G_S pode ser bloqueada por toxinas bacterianas, levando à ativação irreversível da adenilato ciclase. A *toxina da cólera*, por exemplo, é uma enzima que catalisa a transferência de uma unidade ADP-ribose do NAD^+ para um resíduo de arginina da subunidade α_S. Esta modificação covalente determina a perda da atividade GTPásica de α_S, que permanece ligada a GTP, mantendo a adenilato ciclase estimulada mesmo na ausência do hormônio. A toxina da cólera liga-se à superfície das células da mucosa intestinal e é internalizada por endocitose; uma vez no citossol, promove a modificação da G_S. O aumento da concentração intracelular de cAMP acelera a secreção de suco digestivo, resultando em enorme afluxo de íons e água para a luz intestinal, ocasionando a diarréia profusa característica da cólera.

Os níveis de cAMP podem ainda ser aumentados por inibição da fosfodiesterase de cAMP, causada por derivados de purinas, como *cafeína e teofilina*. Estas substâncias também atuam como antagonistas de receptores de *adenosina*. A concentração deste nucleosídio aumenta sempre que o conteúdo celular de ATP diminui como resultado de grande consumo de energia. A adenosina participa da regulação dos sistemas cardiovascular, nervoso, imune e respiratório; neste último caso, provoca broncoconstrição. A teofilina provoca dilatação brônquica e é empregada no tratamento da asma há mais de 70 anos; apesar disto, seu mecanismo de ação ainda é incerto, acreditando-se que envolva outros efeitos além dos citados.

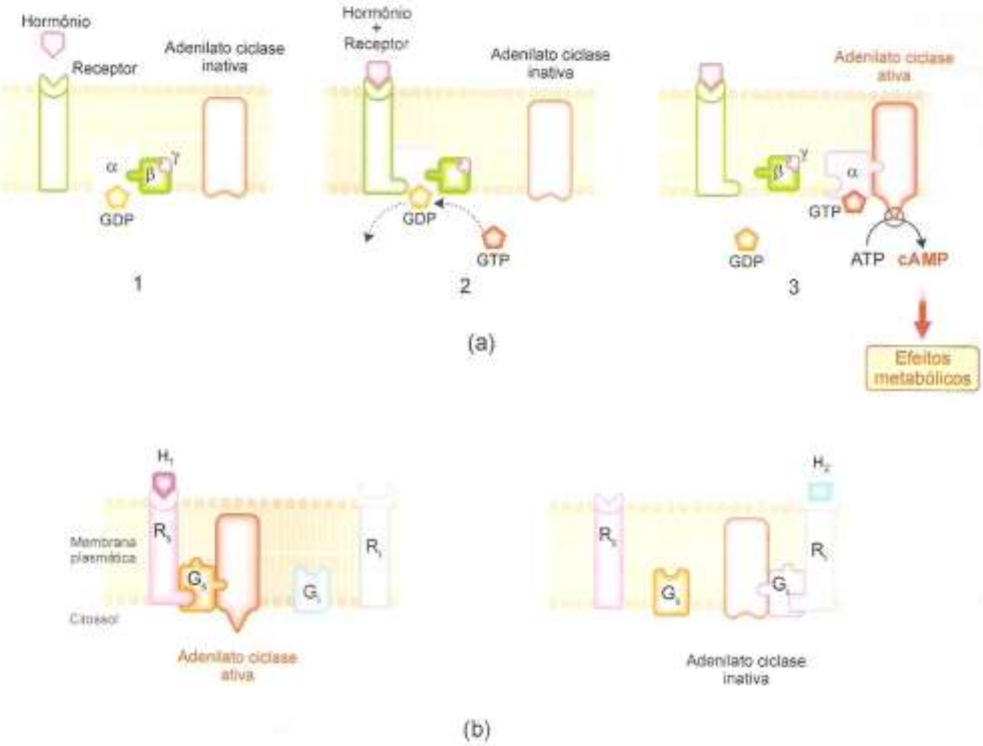


Fig. 19.4 (a) Transdução de sinal de hormônios que estimulam a adenilato ciclase. 1) Situação prévia à ligação do hormônio ao receptor: proteína G com as três subunidades (α-β-γ) associadas e GDP ligado à subunidade α; adenilato ciclase inativa. 2) A formação do complexo hormônio-receptor altera o receptor, causando sua união à proteína G, que, então, troca GDP por GTP. 3) A ligação de GTP à subunidade α da proteína G determina dissociação das subunidades β-γ; o complexo α-GTP liga-se à adenilato ciclase, ativando-a. (b) Representação esquemática da regulação da adenilato ciclase por hormônios estimuladores (H_1) e inibidores (H_2) da sua atividade. O complexo H_1-R_S une-se a uma proteína G_S que ativa a adenilato ciclase, enquanto o complexo H_2-R_i interage com uma proteína G_i que inibe a enzima.

O cAMP estimula a proteína quinase A

O aumento intracelular na concentração de cAMP, conseqüente à ação hormonal, resulta na ativação de um tipo particular de proteína quinase, chamada *proteína quinase dependente de cAMP* ou *proteína quinase A* (*PKA*, de *Protein Kinase A*)[1]. É uma enzima oligomérica, composta por subunidades catalíticas e subunidades reguladoras que, quando associadas, formam um complexo inativo. O cAMP liga-se às subunidades reguladoras, provocando a dissociação das subunidades catalíticas, que se tornam ativas (Fig. 19.5), capazes de promover a transferência do grupo fosfato do ATP para proteínas.

A via de transdução de sinal hormonal descrita até aqui — hormônio complexado ao receptor R_S da membrana plasmática/ligação à proteína G_S/adenilato ciclase estimulada/síntese de cAMP/PKA ativada — é denominada *via da PKA*.

A ação catalítica da PKA pode ser exercida sobre inúmeras proteínas; algumas tornam-se ativas em virtude da fosforilação; outras perdem a atividade. Sendo assim, um mesmo hormônio atuando em vários tecidos, apesar de provocar a mesma seqüência inicial de eventos — ativação da via da PKA —, determina alterações diferentes do padrão metabólico em cada tecido, porque as enzimas que serão fosforiladas em cada tecido também serão diferentes. A resposta metabólica obtida dependerá da equipe de proteínas sintetizadas pelo tecido-alvo do hormônio que causou a estimulação da PKA.

[1]As siglas da denominação inglesa das proteína quinases, e também de outras enzimas, serão adotadas neste texto, graças ao seu uso consagrado na literatura.

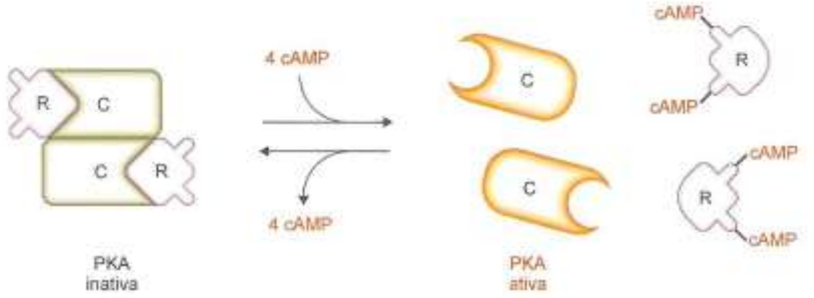


Fig. 19.5 Ativação da proteína quinase dependente de cAMP (PKA). A molécula da enzima inativa é formada por quatro subunidades: duas catalíticas (C) e duas reguladoras (R). A ligação de cAMP às subunidades reguladoras libera as subunidades catalíticas, então ativas.

A atuação de muitos hormônios peptídicos e de catecolaminas e o desempenho de diversas atividades fisiológicas resultam de ativação da via da PKA. Alguns exemplos:

1. *Hormônios da hipófise*: hormônios adrenocorticotrófico (ACTH), tireóide-estimulante (tirotrofina ou TSH), luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH), atuando em glândulas endócrinas, onde estimulam a liberação e/ou a síntese de hormônios específicos — cortisol, hormônios tireoidianos e hormônios sexuais.
2. *Vasopressina* (*hormônio antidiurético*), agindo no rim.
3. Atividades sensoriais, como o *olfato* e a *visão*.
4. *Epinefrina* e *glucagon*: estes hormônios, por estarem diretamente ligados à regulação do metabolismo, serão analisados na próxima seção.

As fosfoproteína fosfatases antagonizam os efeitos da PKA

A fosforilação de proteínas não é permanente, podendo ser revertida por *fosfoproteína fosfatases* (*PP*, de *Phosphoprotein Phosphatases*), enzimas hidrolíticas que removem os grupos fosfatos adicionados pelas proteína quinases, PKA inclusive, devolvendo as proteínas às suas formas desfosforiladas. As fosfoproteína fosfatases são reguladas por modificação covalente: são substratos da PKA e de outras proteína quinases. Um exemplo é a *fosfoproteína fosfatase-1* (*PP-1*), que participa da regulação do metabolismo do glicogênio. PP-1 é constituída por uma subunidade catalítica (subunidade C), que só é capaz de atuar quando está associada à subunidade reguladora (R), que, por sua vez, fica ligada ao glicogênio. O glicogênio e as enzimas que atuam no seu metabolismo e que o regulam organizam-se em grânulos citoplasmáticos — a subunidade R funciona como um elo de ligação entre a subunidade catalítica de PP-1 e suas enzimas-substrato, localizadas nos grânulos. A adição de grupos fosfato à subunidade R pela PKA provoca a dissociação da subunidade C, que, uma vez desligada dos grânulos, fica impossibilitada de atuar sobre os seus substratos. Esta subunidade, então livre no citossol, pode interagir com uma proteína inibidora, chamada de *Inibidor-1* (*I-1*), e tornar-se totalmente inativa. Para que isto ocorra, o Inibidor-1 deve estar fosforilado, à custa da PKA (Fig. 19.6). Assim, a PKA mantém a PP-1, uma enzima cuja ação é antagônica à sua, na forma inativa.

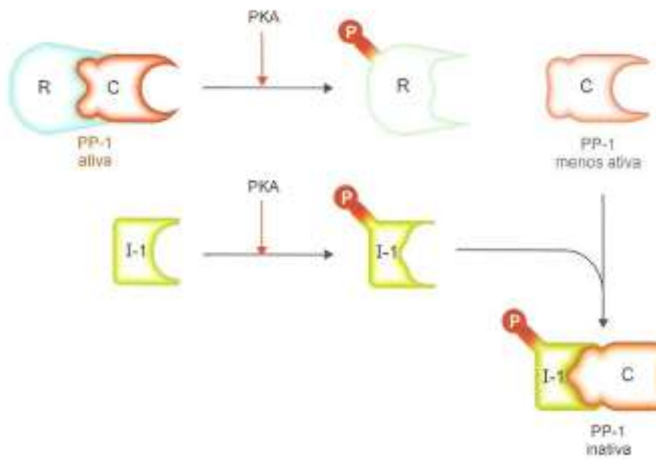


Fig. 19.6 Inibição da fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1) por fosforilação pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA). A forma ativa da PP-1 consta de uma subunidade catalítica (C) e uma reguladora (R), que se liga ao glicogênio (que não está representado na figura). A adição, pela PKA, de grupos fosfato (P) à subunidade R causa sua separação da subunidade C, cuja atividade diminui, por não poder atuar sobre o glicogênio. A interação da subunidade C com o Inibidor-1 (I-1), também fosforilado pela PKA, resulta no bloqueio da PP-1.

Os hormônios que elevam a concentração de cAMP, como epinefrina e glucagon, determinam, portanto, dois eventos de fosforilação na via de controle da PP-1, levando à sua inibição. A insulina tem efeito oposto, estimulando a enzima, por mecanismos ainda não completamente estabelecidos.

Derivados de fosfolipídios de membrana e íons Ca^{2+} também atuam como segundos mensageiros

Vários hormônios que se ligam a receptores da membrana plasmática utilizam vias de transdução de sinal diferentes da via de ativação da PKA. Um exemplo é a *via do fosfatidilinositol bisfosfato*, também chamada *via da fosfolipase C*.

A formação do complexo hormônio-receptor ativa uma proteína G, que estimula uma fosfolipase de membrana, a *fosfolipase C (PC)*. Esta enzima catalisa a hidrólise de *fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2)*, um fosfolipídio minoritário da membrana plasmática, produzindo dois segundos mensageiros, o *inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3)* e o *1,2-diacilglicerol (DG)*, que têm atuações diferentes (Fig. 19.7 a).

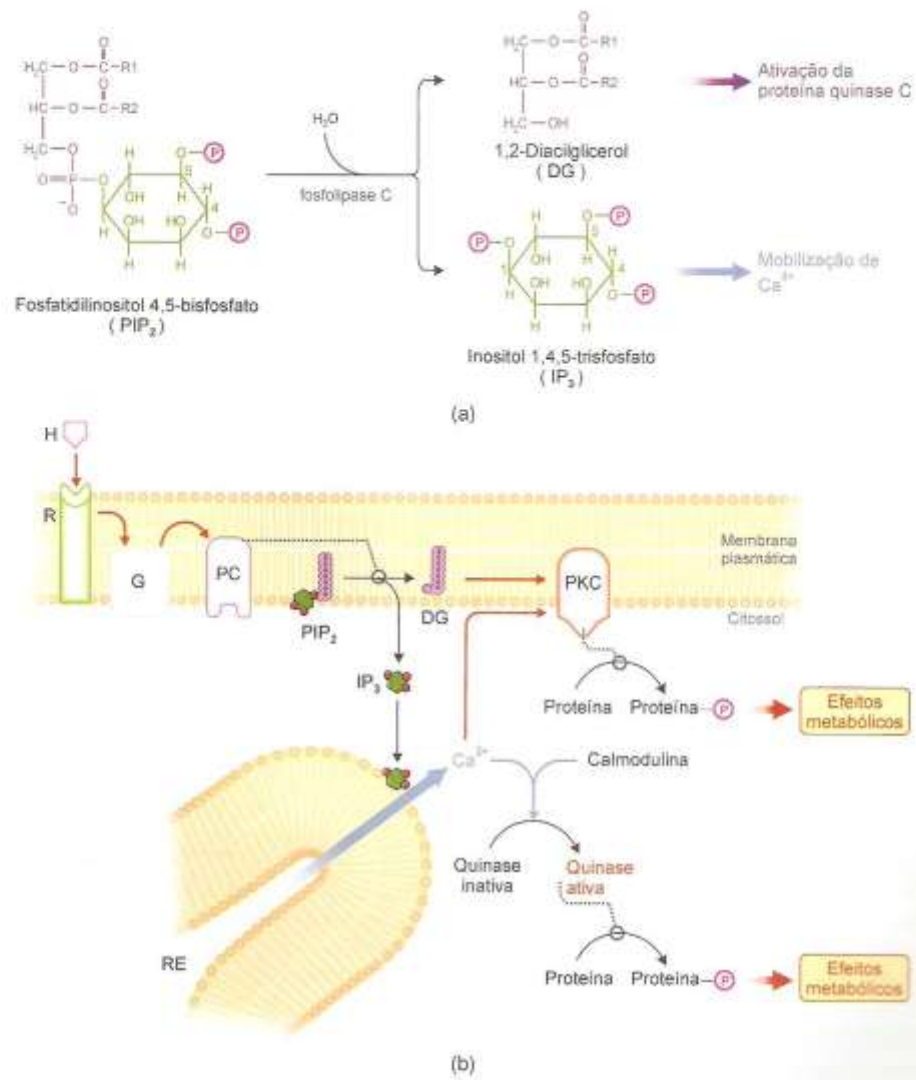


Fig. 19.7 (a) Estruturas do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) e dos produtos de sua hidrólise, catalisada pela fosfolipase C. (b) Via de transdução de sinal do fosfatidilinositol bisfosfato (ou via da fosfolipase C). A seqüência de eventos está descrita no texto. H: hormônio; R: receptor; G: proteína G; PC: fosfolipase C; RE: retículo endoplasmático; PKC: proteína quinase C. O hormônio poderia ser, por exemplo, a epinefrina ligando-se a receptores α_1.

O papel de IP_3 é aumentar a concentração citossólica de Ca^{2+}, que é liberado dos depósitos intracelulares deste íon, as vesículas do retículo endoplasmático ou do retículo sarcoplasmático em células musculares. IP_3, sendo hidrossolúvel, difunde-se pelo citossol e liga-se a receptores da superfície dos reservatórios celulares, induzindo a liberação de Ca^{2+} (Fig. 19.7 b). Os íons Ca^{2+} exercem diversos efeitos por si sós ou quando ligados à proteína *calmodulina*, formando o complexo Ca^{2+} · calmodulina. Nos músculos esqueléticos, os íons Ca^{2+} desencadeiam a contração e promovem a degradação de glicogênio; nos músculos lisos e em outras células, ligam-se à calmodulina e modificam uma série de proteínas, incluindo diversas quinases. Adicionalmente, o Ca^{2+} age como coadjuvante do outro segundo mensageiro, o 1,2-diacilglicerol.

O 1,2-diacilglicerol (DG) permanece ligado à membrana e na presença de íons Ca^{2+}, disponíveis graças a IP_3, estimula uma proteína quinase de membrana, a *proteína quinase C*, assim denominada por depender de **Ca^{2+}**. Esta enzima catalisa a fosforilação de um conjunto de proteínas, diferente do conjunto modificado pelo complexo Ca^{2+} · calmodulina. A alteração da atividade de todas estas proteínas-alvo desencadeia a resposta celular ao hormônio.

Exemplos de hormônios que acionam a via do fosfatidilinositol bisfosfato são a epinefrina, atuando em receptores α_1 (Seção 19.4), a vasopressina e os hormônios hipotalâmicos de liberação de tirotrofina (TRH) e de gonadotrofinas (GnRH), que estimulam a liberação dos hormônios hipofisários TSH, LH e FSH.

O complexo Ca^{2+} · calmodulina e cAMP interagem na regulação da atividade celular

A *calmodulina* (*calmodulin*, de ***cal**cium-**modul**ating prote**in***) ocorre sob forma livre ou constitui a subunidade receptora de íons Ca^{2+} da glicogênio fosforilase quinase. Trata-se de uma proteína pequena, com quatro sítios de ligação para Ca^{2+} (Fig. 19.8). A ocupação destes sítios por Ca^{2+} determina uma mudança de conformação na calmodulina, que pode então ligar-se a várias proteínas-alvo, alterando sua atividade. Nos casos conhecidos de regulação de enzimas pelo *complexo Ca^{2+} · calmodulina* — glicogênio fosforilase quinase, proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina, miosina quinase de músculos lisos etc. —, ocorre sempre ativação. Os processos metabólicos que utilizam Ca^{2+} ou cAMP como segundos mensageiros são interligados: uma mesma enzima pode ser regulada tanto por Ca^{2+} · calmodulina como por cAMP, como ocorre com a glicogênio fosforilase quinase e a miosina quinase de músculos lisos.

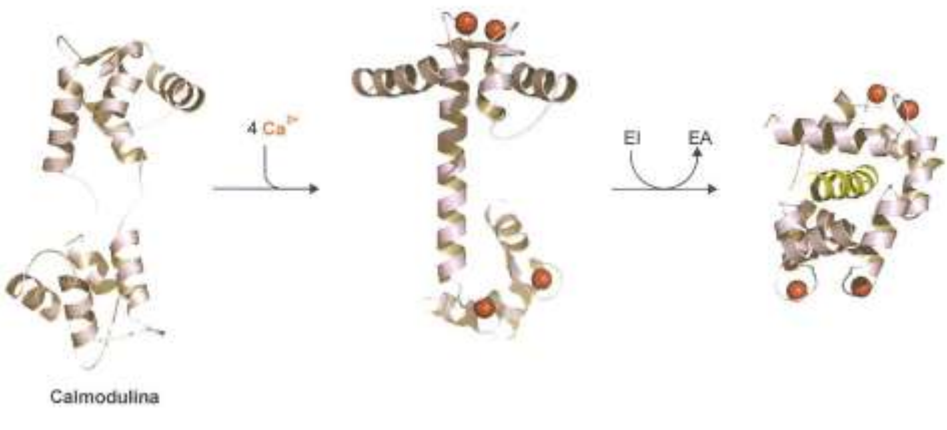


Fig. 19.8 A calmodulina liga-se a íons Ca^{2+} (esferas vermelhas) e sofre uma modificação estrutural, que a torna apta a interagir com suas enzimas-substrato. No exemplo, a enzima é auto-inibida por um segmento de sua cadeia polipeptídica, o peptídio helicoidal assinalado em verde, que bloqueia seu centro ativo (o restante da molécula da enzima foi omitido). O complexo Ca^{2+} · calmodulina dobra-se sobre o peptídio inibidor, removendo-o da enzima inativa (EI), que é convertida na forma ativa (EA).

19.4 EPINEFRINA, GLUCAGON E INSULINA

Os hormônios que têm papel fundamental na regulação do metabolismo — *epinefrina*, *glucagon* e *insulina* — serão discutidos brevemente neste capítulo. ***Sua atuação em vias metabólicas específicas será analisada nos capítulos seguintes.***

A epinefrina tem efeitos metabólicos degradativos

Os hormônios *epinefrina* (ou *adrenalina*[2]) e *norepinefrina* (ou *noradrenalina*) são sintetizados na medula das glândulas supra-renais, também denominadas adrenais, a partir de tirosina (Fig. 19.9). São chamados, juntamente com a dopamina, de *catecolaminas* por sua semelhança estrutural ao catecol. A epinefrina é o principal produto da medula adrenal, constituindo cerca de 80% das catecolaminas. Também são sintetizadas por neurônios autonômicos, onde atuam como neurotransmissores.

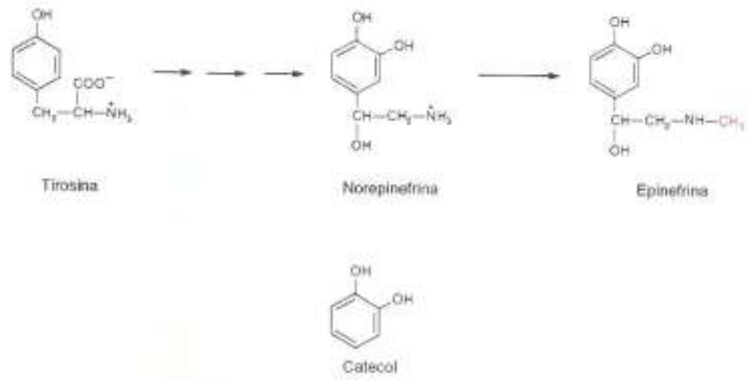


Fig. 19.9 A tirosina é precursora das catecolaminas, assim denominadas por sua semelhança estrutural com o catecol. Por reações de hidroxilação e descarboxilação, a tirosina origina a norepinefrina que é metilada, convertendo-se em epinefrina.

A secreção de epinefrina é provocada por estímulo nervoso autônomo sobre as supra-renais em situações de perigo real ou imaginário, exercício físico, hipoglicemia e exposição a baixas temperaturas. A epinefrina determina uma série coordenada de efeitos que permitem ao indivíduo reagir a essas situações. Entre os efeitos mais importantes estão: glicogenólise muscular e hepática; degradação de triacilgliceróis do tecido adiposo; relaxamento de alguns músculos lisos, como os dos brônquios e das arteríolas dos músculos esqueléticos, facilitando a tomada de ar e a oxigenação dos músculos voluntários; contração dos músculos lisos dos vasos abdominais, desviando mais sangue para os músculos esqueléticos; aumento da força e da freqüência cardíacas. Seus efeitos metabólicos são marcadamente degradativos, contrapondo-se assim aos da insulina e coadjuvando a ação do glucagon.

As diferentes ações da epinefrina sobre os vários tecidos são resultantes da presença de dois tipos de *receptores adrenérgicos*, α e β, nas células-alvo. A distinção entre os dois tipos de receptores é estabelecida com base na atuação de *agonistas*, isto é, substâncias capazes de ligarem-se aos receptores e induzir respostas equivalentes às do hormônio ou de *antagonistas*, compostos que se unem aos receptores, mas sem provocar as ações hormonais. Por mimetizarem ou inibirem os efeitos hormonais, os agonistas e antagonistas têm largo emprego terapêutico. Ainda com base na especificidade ou na potência da ação de agonistas e antagonistas, os receptores α-adrenérgicos são subdivididos em α_1 e α_2.

A ligação epinefrina-receptor α_1 tem seus efeitos mediados pela via da fosfolipase C. Quando se liga a receptores α_2 e β, a via de transdução de sinal acionada é a via da proteína quinase A (PKA): no primeiro caso há inibição da adenilato ciclase e no segundo caso, estimulação. Os receptores α_2 são do tipo R_i e interagem com uma proteína G_i, que inibe a adenilato ciclase; já os β são receptores R_S, que determinam a ativação da adenilato ciclase, mediada por uma proteína G_S.

A atuação da epinefrina na regulação de vias metabólicas resulta, na maioria dos casos, de sua interação com receptores β e do conseqüente aumento de atividade da PKA.

[2]O termo *adrenalina* referia-se, originalmente, a um extrato das glândulas supra-renais contendo uma mistura de *epinefrina* (por ser sintetizada em glândulas localizadas sobre os rins) e *norepinefrina* (o prefixo *nor* refere-se à ausência do grupo metila existente na epinefrina, cuja estrutura foi determinada primeiramente).

A inibição da adenilato ciclase via receptores adrenérgicos α_2 é bloqueada pela *toxina da coqueluche* que, analogame à toxina da cólera, catalisa a modificação covalente da proteína G_i. Neste caso, G_i torna-se incapaz de trocar GDP p GTP, ficando impossibilitada de se complexar com a adenilato ciclase e causar a sua inibição; o resultado é a ativa permanente da enzima.

O *cortisol*, um hormônio esteróide produzido pelo córtex das supra-renais, atua conjuntamente com a epinefrin resposta do organismo ao estresse, aumentando a disponibilidade de substratos oxidáveis. Promove a gliconeogêne por meio de duas ações: estimula a proteólise e a conseqüente liberação de aminoácidos dos tecidos periféricos (m culos, principalmente) e induz a síntese de enzimas-chave da gliconeogênese. Estimula também a lipólise, contribuin para a elevação do teor de ácidos graxos circulantes.

O glucagon é liberado em resposta à hipoglicemia

O glucagon é um peptídio formado por 29 aminoácidos, sintetizado pelas células α das ilhotas de Langerhans d pâncreas. É liberado na corrente sangüínea quando a concentração de glicose circulante é baixa (hipoglicemia). Se papel fisiológico principal é aumentar a produção e, portanto, a exportação de glicose pelo fígado, de modo a elevar glicemia. O glucagon determina este resultado por estimular as vias que produzem glicose — degradação de glicog nio e gliconeogênese — e inibir aquelas que a consomem — síntese de glicogênio e glicólise.

Seus efeitos metabólicos, com exceção da estimulação da síntese de glicose nos hepatócitos, são eminenteme degradativos (Tabela 19.3), incidindo sobre carboidratos, lipídios e proteínas, em especial no fígado e tecido adipo Essas ações do glucagon fazem parte da adaptação do organismo a situações de carência de nutrientes.

Tabela 19.3 Efeitos metabólicos de insulina e glucagon

	Insulina	Glucagon
Glicemia	↓	↑
Glicólise	↑	↓
Gliconeogênese	↓	↑
Glicogenólise	↓	↑
Glicogênese	↑	↓
Lipólise	↓	↑
Lipogênese	↑	↓
Cetogênese	↓	↑

↑ = glicemia ou velocidade da via aumentada; ↓ = glicemia ou velocidade da via diminuída.

A transdução de sinal do glucagon ocorre pela via da proteína quinase A (PKA). O glucagon liga-se a seu recept (R_s) na membrana plasmática das células-alvo e o receptor passa a interagir com uma proteína G_s, que estimula a ade nilato ciclase: o nível de cAMP aumenta, resultando na ativação da PKA. As reações de fosforilação catalisadas pe PKA são responsáveis pela interferência do glucagon no metabolismo e na transcrição gênica. A transdução de sin do glucagon também é feita pela via da fosfolipase C, assunto este que não será abordado neste texto.

A regulação da secreção de glucagon durante a hipoglicemia é complexa, envolvendo a participação de divers fatores. É estimulada por epinefrina, também liberada nessa condição. A glicose, direta ou indiretamente, por açã mediada por insulina, inibe a secreção de glucagon; este fenômeno ilustra a oposição funcional entre glucagon e in sulina. No diabetes, estes mecanismos de controle estão alterados: a secreção de glucagon diminui na hipoglicemia e permanece elevada na hiperglicemia.

A insulina é liberada em resposta à hiperglicemia

A insulina é uma proteína pequena, formada por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas liga das por pontes dissulfeto (Fig. 19.10). É secretada pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, em respost a hiperglicemia, e tem efeitos metabólicos antagônicos aos do glucagon (Tabela 19.3) — os níveis dos dois hormônio sofrem uma alternância periódica estritamente regulada. Na deficiência de insulina, como no *diabetes tipo 1*, os níve de glucagon aparecem sempre muito elevados.



Fig. 19.10 Estrutura da insulina humana. A insulina é sintetizada como única cadeia polipeptídica, contendo mais 24 aminoácidos ligados ao resíduo B_1 e 35 aminoácidos ligando B_{30} a A_1. Por ação de enzimas hidrolíticas, estes segmentos são eliminados, restando as duas cadeias unidas por pontes dissulfeto que constituem a forma funcional do hormônio.

A insulina liga-se a seu receptor na superfície celular, desencadeando cascatas de sinais intracelulares que regulam muitos processos celulares. Em relação à homeostase de glicose, incluem-se as funções da insulina de aumentar a tomada de glicose pelos tecidos periféricos (músculos e tecido adiposo) e de suprimir a síntese de glicose no fígado.

Níveis altos de insulina provocam diminuição do número de seus receptores

Há uma relação inversa entre a concentração plasmática de insulina e o número de seus receptores. Como acontece com outros hormônios que se ligam a receptores na superfície celular, a forma de manter esta regulação é a endocitose do complexo insulina-receptor, seguida por proteólise da insulina e de parte dos receptores, e pelo retorno do restante deles para a membrana. Na ausência do hormônio, os receptores são sintetizados, restabelecendo a sua quantidade normal. Quando o nível de insulina é mantido alto, a recomposição dos receptores não se completa e, a longo prazo, verifica-se uma diminuição do seu número. É o que ocorre no diabetes tipo 2, em que há uma diminuição da resposta celular à insulina, frente a níveis aumentados do hormônio.

O receptor da insulina tem atividade de proteína quinase

O receptor de insulina, presente na membrana plasmática das células-alvo, é uma glicoproteína constituída por duas subunidades α e duas β, ligadas por pontes dissulfeto (Fig. 19.11).

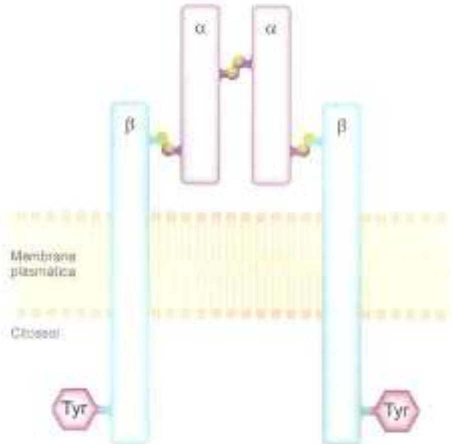


Fig. 19.11 O receptor de insulina é uma proteína transmembrana formada por quatro subunidades ($\alpha_2\beta_2$), unidas por pontes dissulfeto (cada uma representada por duas pequenas esferas unidas). A ligação do hormônio se dá nas subunidades α; os segmentos internos das subunidades β contêm diversos resíduos de tirosina (Tyr) passíveis de autofosforilação (a figura mostra somente um destes resíduos em cada subunidade β).

As subunidades α situam-se extracelularmente e as subunidades β atravessam a membrana plasmática. A porção citoplasmática das subunidades β apresenta atividade de proteína quinase, específica para resíduos de tirosina — *tirosina quinase* — e contém resíduos de tirosina suscetíveis a fosforilação. A ligação da insulina às subunidades α ativa as subunidades β, que catalisam a fosforilação cruzada daqueles resíduos, ou seja, uma subunidade β fosforila tirosinas da outra subunidade β. A autofosforilação do receptor faz aumentar sua atividade intrínseca de tirosina quinase, o que desencadeia a fosforilação em cascata de uma série de proteínas sinalizadoras, muitas das quais são também proteína quinases.

O evento inicial de estimulação da atividade de tirosina quinase do receptor desencadeia todas as ações da insulina, que incidem em processos tão diversos quanto o transporte de metabólitos, a regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, e a proliferação e a diferenciação celulares. A partir desse evento comum, são acionadas diferentes vias de transdução de sinal, responsáveis pelos múltiplos efeitos da insulina. O conhecimento atualmente disponível sobre um destes efeitos — o aumento da permeabilidade da membrana plasmática à glicose —, descrito há mais de 50 anos, permanece incipiente. Tal constatação exemplifica a complexidade das bases moleculares das atuações da insulina.

A insulina aumenta o transporte de glicose para o interior das células

O transporte de glicose através da membrana plasmática das células de mamíferos é um processo passivo, catalisado por uma família de permeases, denominadas *GLUT* (de ***Glu**cose **T**ransporter*) 1 a 12, segundo a ordem de sua descoberta. Estes transportadores diferem quanto à distribuição pelos tecidos, às propriedades cinéticas e à especificidade em relação ao substrato (alguns transferem também outros açúcares); são, ainda, sensíveis ou não à insulina.

O grupo mais bem caracterizado de GLUTs compreende GLUT 1 a 4. *GLUT 1, 3 e 4* são proteínas com alta afinidade por glicose exibindo valores de K_M entre 2 e 4 mM, que se situam abaixo do intervalo normal de concentração de glicose sangüínea que se estende de 5 a 8 mM (ver Fig. 21.1 a) — são responsáveis pela captação basal do açúcar. *GLUT 2* tem baixa afinidade por glicose, com K_M entre 15 e 25 mM, contribuindo para a captação de glicose apenas quando a glicemia aumenta, como após as refeições. Das quatro permeases referidas, somente *GLUT 4* é dependente de insulina.

GLUT 1 tem distribuição ubíqua, sendo mais abundante em células que obtêm energia exclusivamente a partir de glicose, como hemácias e cérebro; ocorre também em quantidades moderadas no tecido adiposo, músculos e fígado.

GLUT 2 é expresso primariamente nas células β do pâncreas e no fígado. Em hiperglicemia, a velocidade do transporte de glicose por GLUT 2 é diretamente proporcional à concentração do substrato (K_M muito acima da glicemia normal), ao passo que os outros transportadores do grupo estão saturados, funcionando em velocidades constantes. Por esta razão, GLUT 2 atua como um sensor de glicose nas células β do pâncreas — no estado pós-prandial, quando a glicemia aumenta, essas células respondem com liberação de insulina. O fígado tem uma situação especial no que se refere à dependência de insulina: embora GLUT 2, que medeia a entrada de glicose, seja insensível ao hormônio, o fígado depende da insulina para a síntese de glicoquinase, sem a qual não pode utilizar a glicose. GLUT 2 é ainda encontrado no intestino e rins, onde também transporta frutose.

GLUT 3 é o principal transportador do cérebro. Sua alta afinidade pelo substrato (tem o menor K_M para glicose) é coerente com a necessidade de glicose pelo cérebro, garantindo a utilização mesmo quando a glicemia é baixa.

GLUT 4 catalisa o transporte de glicose nos tecidos adiposo e muscular (esquelético e cardíaco), que pode ser aumentado por insulina de 10 a 20 vezes, em poucos segundos. A transferência de glicose para o interior dessas células resulta em diminuição do aumento pós-prandial do nível de glicose plasmática, o efeito mais rápido e marcante da insulina. GLUT 4 fica armazenado em vesículas citossólicas que, na presença de insulina, são deslocadas para a membrana plasmática com a qual se fundem por exocitose, posicionando GLUT 4 na membrana (Fig. 19.12). O estímulo da entrada de glicose deve-se, portanto, ao maior número de moléculas de GLUT presentes na superfície celular.

A atividade física promove igualmente o deslocamento de GLUT 4 do interior da célula para a membrana, aumentando a permeabilidade das fibras musculares à glicose. Este efeito permanece normal na vigência da resistência à insulina e, por esta razão, o exercício é recomendado para o controle da glicemia em portadores de diabetes. Diversas hipóteses têm sido propostas, mas ainda não totalmente comprovadas, para explicar este resultado do exercício (Seção 19.5).

A insulina facilita ainda o transporte de aminoácidos para as células, particularmente as musculares.

O mecanismo da estimulação do transporte de glicose por insulina continua indeterminado

A mobilização de GLUT 4 dos estoques internos para a membrana plasmática envolve a participação de, pelo menos, duas vias de transdução de sinal de insulina. Segue-se uma descrição sumária de uma destas vias, a *via da fosfatidilinositol 3-quinase* (*PI3K*, de ***P**hosphatidyl**i**nositol **3-K**inase*).

Na *via da PI3K* (Fig. 19.12), o receptor, na presença de insulina, sofre autofosforilação e liga-se a uma proteína denominada *IRS* (de ***I**nsulin **R**eceptor **S**ubstrate*). IRS pertence à família das chamadas *proteínas adaptadoras*, que apresentam a propriedade de se ligar aos resíduos fosforilados de tirosina do receptor. O receptor, então com a atividade de tirosina quinase estimulada, fosforila IRS. As proteínas adaptadoras, quando fosforiladas, funcionam como adesivos moleculares, recrutando os demais componentes intracelulares da cascata de sinalização e conectando-os ao receptor ativado na superfície celular. Um destes efetores é a lipídio quinase que empresta seu nome à via — *fosfatidilinositol 3-quinase*

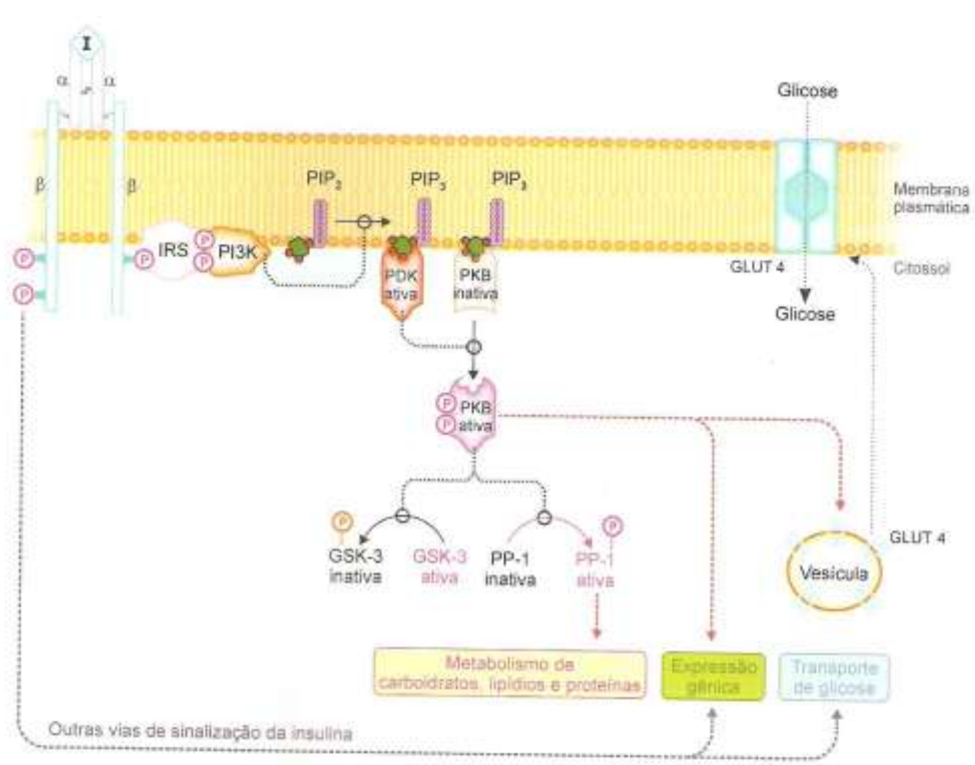


Fig. 19.12 Via de transdução de sinal da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Na presença de insulina, o receptor é estimulado e adiciona grupos fosfato (Ⓟ) a resíduos de tirosina de suas subunidades β. A proteína adaptadora IRS liga-se a estes resíduos e é fosforilada pelo receptor. Uma vez nesta forma, IRS associa-se a PI3K, que se torna ativa e converte PIP_2 em PIP_3. Duas proteína quinases citossólicas ancoram-se nas moléculas de PIP_3: PDK e PKB. A união a PIP_3 aproxima as quinases e estimula PDK, que fosforila PKB, ativando-a. PKB, então, passa a atuar sobre os diversos processos celulares controlados por insulina: o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (por fosforilar GSK-3, PP-1 e outras enzimas), a expressão gênica e o transporte de glicose.

(*PI3K*) —, que se associa aos resíduos fosforilados de tirosina de IRS e se torna estimulada. A enzima introduz um grupo fosfato no carbono 3 do anel inositol de um fosfolipídio da membrana plasmática, o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), convertendo-o em *fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato* (*PIP_3*).

O aumento da concentração de PIP_3 cria, em regiões restritas da membrana, ancoradouros moleculares para proteínas que, na ausência da insulina, encontram-se dispersas no citossol. Várias proteínas sinalizadoras têm domínios que se ligam especificamente a este fosfoinositídio. Da união com PIP_3, resultam a ativação e a aproximação dessas proteínas, que se organizam em complexos sinalizadores que atuam coordenada e seqüencialmente.

Uma das proteínas que é estimulada por ligação a PIP_3 é a *proteína quinase dependente de fosfoinositídio* (*PDK*, de *Phosphoinositide-dependent Kinase*). PDK fosforila, e estimula, algumas proteína quinases, das quais se destaca a *proteína quinase B* (*PKB*), também chamada de *Akt*, por ser produto do proto-oncogene[3] *akt*. Esta quinase interage com as vesículas de GLUT 4, provocando sua transferência para a membrana plasmática (Fig. 19.12).

Os mecanismos responsáveis por este deslocamento permanecem controversos. Tendo em vista que as vesículas contendo GLUT 4, ao migrarem para a superfície celular, têm de atravessar o citoplasma, um nível previsível de regulação do processo é a organização do citoesqueleto. Com efeito, uma outra cascata de sinalização de insulina, que

[3]*Proto-oncogenes* são genes normais que podem sofrer mutações e se converter em oncogenes (do grego *ónkos*, que significa massa, tumor). *Oncogenes* são genes capazes de transformar uma célula normal em cancerosa, por induzirem sua multiplicação descontrolada, levando à formação de tumores. Os oncogenes originam-se, menos freqüentemente, de vírus.

não será analisada neste texto, introduz modificações na estrutura da *actina*, um dos componentes do citoesqueleto: os rearranjos dos filamentos de actina criariam um sistema propulsor das vesículas contendo GLUT 4. Até o presente, as bases moleculares deste sistema não são conhecidas.

Os eventos que determinam a finalização do sinal de insulina são ainda menos compreendidos. Postula-se que o retorno do receptor ativado ao estado basal possa ser causado por modificações em sua estrutura decorrentes de: remoção de grupos fosfato mediada por fosfatases específicas para resíduos de tirosina, fosforilação de resíduos de serina e treonina que impediriam a autofosforilação ou por degradação de PIP_3, catalisada por fosfatases.

A insulina interfere na fosforilação e na síntese de enzimas

A via de transdução de sinal da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), além de promover o transporte de glicose, participa da regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, da transcrição gênica e da síntese proteica. O acontecimento básico, subjacente a todas essas intervenções da insulina, seria a adição de grupos fosfato a proteínas reguladoras pela proteína quinase B (PKB), modificando o funcionamento dessas proteínas. Deste modo, PKB, o componente final da via da PI3K, efetua a conexão entre o hormônio e o controle do metabolismo (Figs. 19.12 e 19.13).

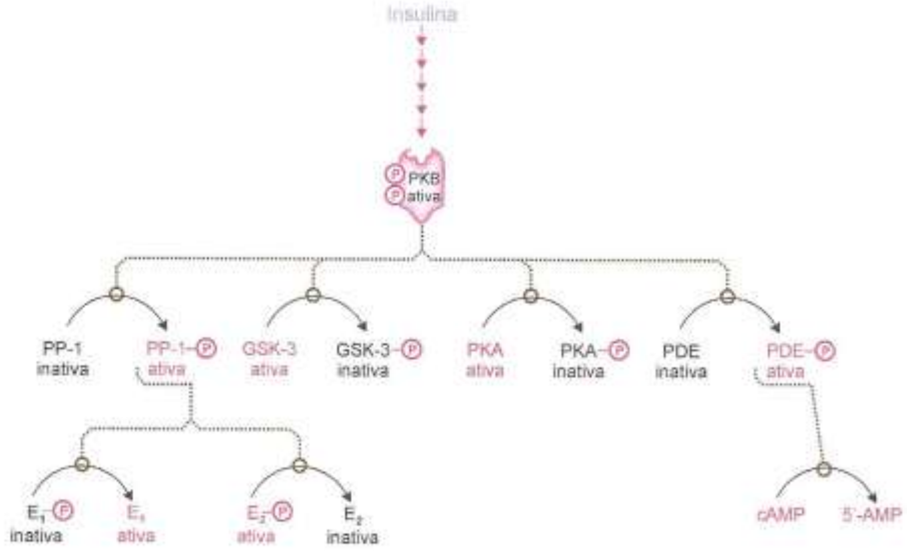


Fig. 19.13 Desfosforilação de enzimas por insulina, mediada pela proteína quinase B (PKB). A insulina liga-se a seu receptor e a via da PI3K é acionada, culminando com a fosforilação e ativação da PKB (Fig. 19.12). PKB fosforila a fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1), que se torna ativa, e as proteína quinases (GSK-3 e PKA), que ficam inativas. PP-1, então, remove os grupos fosfato das enzimas-modelo E_1 e E_2 e as proteína quinases deixam de fosforilar estas enzimas. Adicionalmente, PKB fosforila e estimula a fosfodiesterase de cAMP (PDE): diminui a concentração de cAMP, o que contribui para a inibição da PKA. O resultado é o predomínio das formas desfosforiladas das enzimas: ativa no caso de E_1 e inativa para E_2.

Muitas das interferências da insulina sobre o metabolismo resultam de alterações da atividade de enzimas, decorrentes de sua *desfosforilação*. Assim, a remoção de grupos fosfatos das enzimas mostradas na Tabela 19.2 resulta em inversão de suas propriedades: as que eram ativas na forma fosforilada tornam-se inativas quando desfosforiladas e vice-versa. A insulina determina essa modificação covalente por causar:

1. ativação de fosfoproteína fosfatases;
2. ativação da fosfodiesterase de cAMP, levando à diminuição do nível de cAMP e à desativação da proteína quinase dele dependente (PKA);
3. inibição da própria PKA.

Tais ações da insulina convergem para as formas desfosforiladas das proteínas substratos da PKA e explicam seu antagonismo ao glucagon e à epinefrina.

A causa mais importante da desfosforilação de proteínas por insulina é a ativação de fosfoproteína fosfatases, a principal sendo a fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1). O estímulo da PP-1 seria obtido por fosforilação da sua subunidade reguladora por PKB. Este evento de fosforilação de PP-1 não é conhecido em detalhe, mas sabe-se que tem como alvo resíduos de aminoácidos diferentes daqueles fosforilados pela PKA, que inibe a PP-1, ao contrário da PKB. Os outros dois efeitos (itens 2 e 3), por bloquearem a PKA, contribuem para o predomínio do estado desfosforilado de enzimas; também envolveriam fosforilação por PKB (Fig. 19.13).

Como acontece com a PKA, outras enzimas-alvo de PKB tornam-se inibidas por fosforilação, colaborando, indiretamente, para manter as proteínas desfosforiladas. Um exemplo é a *glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3)*, que, em células não estimuladas, é ativa constitutivamente e catalisa a adição de grupos fosfato a várias enzimas[4], inclusive a glicogênio sintase, inibindo-as. Com insulina, PKB fosforila e inativa GSK-3 (Fig. 19.13), suspendendo o bloqueio antes exercido sobre certas vias metabólicas, como a síntese de glicogênio.

Em síntese, que não pode ser considerada definitiva, a insulina promove a desfosforilação de enzimas que participam de vias metabólicas fundamentais por intermédio da fosforilação, catalisada pela PKB, de algumas famílias de enzimas reguladoras de atuação mais geral, como fosfoproteína fosfatases e proteína quinases. A fosforilação de fosfoproteína fosfatases (PP-1) leva à sua estimulação e elas passam a remover os grupos fosfato das enzimas; a fosforilação de proteína quinases (GSK-3, PKA) causa inativação e elas deixam de fosforilar as enzimas. Adicionalmente, PKB fosforila e ativa a fosfodiesterase de cAMP: o cAMP é hidrolisado e a PKA fica inativa. O resultado é o predomínio da forma desfosforilada das enzimas (E1 e E2 na Fig. 19.13). Nesta forma, algumas (E1, que representa a glicogênio sintase) são ativas, enquanto outras (E2 ou a glicogênio fosforilase) são inativas (ver Fig. 20.4, Seção 20.1.2).

Além de modificar a atividade enzimática, a insulina determina alterações na concentração de enzimas nos seus tecidos-alvo, em especial nos músculos esqueléticos e cardíaco, tecido adiposo e fígado, por intervenção na velocidade de transcrição dos genes que as codificam. Conhecem-se, atualmente, dezenas de RNAs mensageiros cuja síntese é regulada por insulina. O hormônio inibiria a transcrição gênica por causar a fosforilação de fatores de transcrição que, nesta forma, ficariam retidos no citoplasma. Este poderia ser o mecanismo da diminuição da concentração de fosfoenolpiruvato carboxiquinase e de glicose 6-fosfatase, enzimas da gliconeogênese. Um outro nível de atuação da insulina é a tradução de RNAs mensageiros: ela modula a síntese proteica por meio da fosforilação de proteínas ribossomais e de fatores de iniciação e de alongamento. A modulação da expressão gênica por insulina envolve a participação de proteína quinases da via da PI3K, destacando-se a PKB, e de outras vias de transdução de sinal, que não serão abordadas neste texto.

A insulina age no cérebro, regulando o apetite e o metabolismo da glicose

Os efeitos metabólicos da insulina (Tabela 19.3) resultam da atuação direta do hormônio nos tecidos-alvo, onde se liga a seus receptores e aciona suas vias de transdução de sinal. Todavia, a insulina exerce um controle adicional, graças à possibilidade de agir diretamente no cérebro. De fato, o conceito tradicional de que o cérebro é insensível à insulina tem sido revisto diante de evidências, entre outras, que demonstram a expressão do receptor de insulina e do transportador de glicose insulino-dependente, GLUT 4, no hipotálamo. O hipotálamo coordena os sinais nutricionais e hormonais, desempenhando um papel decisivo na regulação do balanço energético e do metabolismo da glicose. Determinados efeitos da insulina no sistema nervoso central coincidem com os da leptina, que também tem seus receptores concentrados no hipotálamo: ambas sinalizam saciedade, diminuindo o apetite. Resultados obtidos nos últimos cinco anos indicam que insulina e leptina ativam a mesma via de transdução de sinal, a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no hipotálamo, o que explicaria, pelo menos em parte, a similaridade de seus efeitos. Na obesidade, a tomada de alimento permanece em níveis normais ou aumentados apesar das altas concentrações plasmáticas dos dois hormônios, sugerindo uma resistência hipotalâmica à sinalização hormonal. Admite-se que distúrbios na via de sinalização da PI3K poderiam contribuir para a resistência hipotalâmica, como verificado na resistência periférica à insulina, típica de indivíduos diabéticos.

Dentre as ações da insulina nos tecidos periféricos, a inibição da gliconeogênese hepática é a que mais tem sido relacionada com sua atuação no cérebro: além de bloquear a via diretamente no fígado, a insulina ativa um circuito nervoso autonômico hipotálamo-fígado, que inibe a gliconeogênese hepática. Trata-se, portanto, de um novo elo de ligação entre a regulação do peso corpóreo e o controle dos níveis plasmáticos de glicose. Um maior entendimento

[4]A enzima GSK-3, diferentemente do que seu nome indica, não é específica para a glicogênio sintase; trata-se de uma proteína quinase.

deste novo mecanismo de regulação da síntese de glicose poderá ter desdobramentos importantes para o tratamento do diabetes.

A caracterização do diabetes e a análise de algumas alterações metabólicas que acarreta serão analisadas no Capítulo 21 (Seção 21.4).

19.5 PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE AMP (AMPK)

Na última década, tem sido reconhecida uma importância crescente da *proteína quinase dependente de AMP* (AMPK) como um agente regulador do balanço energético das células de mamíferos. AMPK é uma enzima ubíqua, cuja atividade aumenta em situações de estresse como hipóxia, jejum etc. e na atividade física, quando o consumo de ATP provoca aumento na razão AMP/ATP. Sua estimulação resulta de regulação alostérica por AMP e de modificação covalente. O grau de fosforilação da AMPK depende das ações de proteína quinases e proteína fosfatases específicas, cuja caracterização ainda é incipiente. A enzima causa o bloqueio de vias que consomem ATP, como síntese de ácidos graxos e de colesterol, e a ativação de vias que levam à produção de ATP, como a oxidação de ácidos graxos, além de interferir no controle de outras vias metabólicas. Recentemente, demonstrou-se que a atividade da isoenzima hipotalâmica diminui em resposta a estímulos que reduzem a ingestão de alimentos, como os hormônios insulina e leptina e a oferta aumentada de nutrientes. Deste modo, além de regular a oxidação ou o armazenamento de substratos nos tecidos periféricos, a AMPK participa do controle central do apetite.

O transporte de glicose em músculos esqueléticos de mamíferos é estimulado por insulina e pelo exercício. Nos dois casos, o resultado deve-se à translocação de moléculas de GLUT 4 para a membrana plasmática (Seção 19.4), mas os mecanismos que sinalizam a movimentação dos transportadores de glicose parecem ser diferentes. Aqueles operantes durante o exercício seriam insulino-independentes, mediados por AMPK. AMPK é ativada na contração muscular, que demanda um alto consumo de ATP, e seria dirigida para o núcleo, onde ativaria a expressão de genes envolvidos na captação de glicose, como o de GLUT 4. É sabido que o mecanismo de ação de certos antidiabéticos orais envolve a ativação da AMPK. O interesse na AMPK como alvo para o desenvolvimento de agentes farmacológicos para o tratamento da obesidade e do diabetes tipo 2 intensificou-se após a descoberta de sua atuação na regulação da saciedade. Embora as bases moleculares do efeito do exercício não sejam completamente conhecidas, sua aplicação terapêutica é fundamental para diabéticos e obesos, por causar uma melhora significativa na resistência à insulina.

BIBLIOGRAFIA

Barnes PJ: Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons. *Proc Am Thorac Soc* **2** (4):334-339, 2005.

Boden G, Shulman GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* **32** Suppl 3:14-23, 2002.

Bouché C et al: The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev* **25** (5):807-830, 2004.

Chang L et al: Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* **10** (7-12):65-71, 2004.

Desvergne B et al: Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* **86**:465-514, 2006.

Gual P et al: Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87** (1):99-109, 2005.

Guy DA et al: Differing physiological effects of epinephrine in type 1 diabetes and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288** (1):E178-186, 2005.

Itani SI et al: Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **52**:1635-1640, 2003.

Jiang G, Zhang BB: Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** (4):E671-678, 2003.

Niswender KD et al: Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* **52** (2):227-31, 2003.

Pocai A et al: Did a muscle fuel gauge conquer the brain? *Nat Med* **12** (1):50-1, 2006.

Seeley RJ, Tschöp M: How diabetes went to our heads. *Nat Med* **12** (1):47-49, 2006.

Whiteman EL et al: Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **13** (10):444-451, 2002.

Wood IS, Trayhurn P: Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89** (1):3-9, 2003.

Zierath JR: Exercise effects of muscle insulin signaling and action. Invited review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **93** (2):773-781, 2002.

20

Regulação das Vias Metabólicas Principais

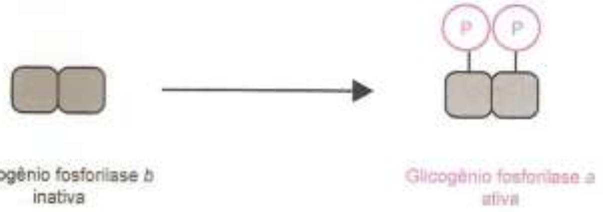
20.1 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

A degradação e a síntese de glicogênio são efetuadas por vias distintas e, evidentemente, ativadas em situações fisiológicas opostas. As regulações alostérica e hormonal destas vias são coordenadas, de tal modo que a estimulação de uma delas ocorre simultaneamente com a inibição da outra. Os mecanismos de controle operantes em músculos esqueléticos serão descritos inicialmente e, a seguir, aqueles existentes no fígado.

20.1.1 REGULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO GLICOGÊNIO MUSCULAR

Regulação por Modificação Covalente

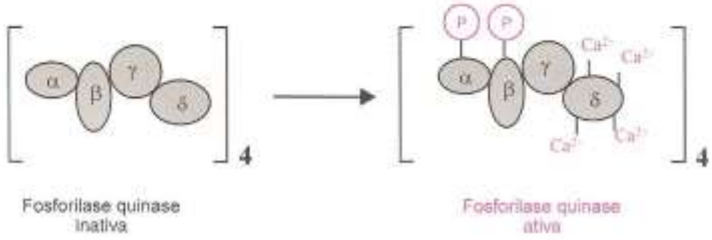
A *glicogênio fosforilase*, a enzima responsável pela glicogenólise, é um dímero e existe em duas formas: a forma *b* (inativa) e a forma *a* (ativa).



A ativação da enzima é obtida por fosforilação de um resíduo de serina de cada monômero da forma *b* (inativa), que se converte na forma *a* (ativa). A reação é catalisada pela glicogênio fosforilase quinase, que também existe em duas formas, uma inativa e outra ativa.

A *glicogênio fosforilase quinase* (ou *fosforilase quinase*) de músculos esqueléticos é composta por quatro cadeias polipeptídicas diferentes, com a composição $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$. A subunidade catalítica é γ; as outras subunidades têm papel regulador da atividade da enzima. A fosforilase quinase pode ser ativada por dois processos distintos:

1. Fosforilação das cadeias α e β pela proteína quinase A (PKA), ativada por cAMP (AMP cíclico) produzido sob estímulo de epinefrina interagindo com receptores β.
2. Ligação da subunidade δ, idêntica à calmodulina, a íons Ca^{2+}, liberados dos depósitos intracelulares para o citossol das fibras musculares durante a contração, em resposta a um estímulo nervoso.



A atividade máxima da enzima é obtida com a configuração representada para a forma ativa no esquema anterior.

A degradação do glicogênio muscular pode, então, ser provocada, em primeira instância, por estímulo hormonal, que ativa a via da PKA (Seção 19.3), ou nervoso, que aumenta a concentração citossólica de Ca^{2+}. No primeiro caso, o mediador intracelular é cAMP e, no segundo caso, íons Ca^{2+}. O processo completo de ativação da glicogênio fosforilase resulta de uma seqüência de ativações enzimáticas, conhecida como *cascata enzimática* (Fig. 20.1). Revendo o processo em ordem cronológica de seus eventos, tem-se:

1. Ligação de epinefrina a receptores β;
2. Modificação da proteína G e troca de GDP por GTP;
3. Ativação da adenilato ciclase pela subunidade α da proteína G, ligada a GTP;
4. Produção de cAMP pela adenilato ciclase;
5. Ligação de cAMP às subunidades reguladoras da PKA, liberando as subunidades catalíticas, ativas;
6. Fosforilação, e ativação, da glicogênio fosforilase quinase pela PKA;
7. Fosforilação da forma *b* da glicogênio fosforilase pela glicogênio fosforilase quinase, convertendo-a na forma *a*, ativa;
8. Degradação do glicogênio pela glicogênio fosforilase.

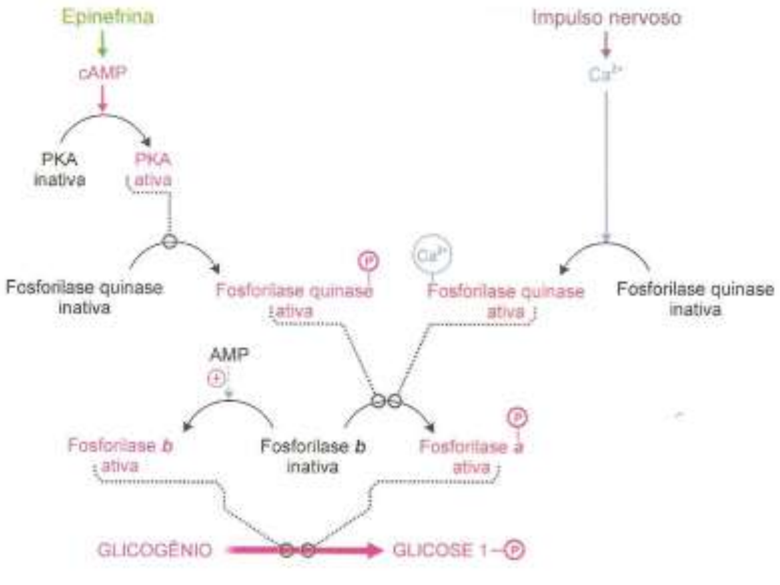


Fig. 20.1 Cascata enzimática de ativação da degradação do glicogênio muscular, desencadeada por estímulo hormonal ou nervoso. A epinefrina induz aumento da concentração de cAMP, que estimula a proteína quinase A (PKA); o estímulo nervoso faz subir o teor citossólico de íons Ca^{2+}. A fosforilase quinase, uma vez ativada por fosforilação ou por ligação com íons Ca^{2+}, fosforila a fosforilase *b*, convertendo-a na forma ativa, a fosforilase *a*, que catalisa a glicogenólise. A mesma conversão resulta de ativação alostérica por AMP. Ⓟ = grupo fosfato (PO_3^{2-}).

A cascata enzimática tem grande efeito amplificador, porque, iniciando-se com baixíssimas concentrações de hormônio, inclui ativações intermediárias de enzimas que catalisam, por sua vez, a ativação de outras enzimas. Assim, o estímu-

lo hormonal é aumentado de muitas ordens de grandeza. Adicionalmente, o estímulo nervoso que causa o aumento da concentração sarcoplasmática de Ca^{2+} é quase sempre acompanhado da liberação de epinefrina. As estimulações sobre a degradação do glicogênio são, portanto, convergentes, ainda mais porque, quando as subunidades α e β estão fosforiladas, a afinidade da enzima por Ca^{2+} é maior, promovendo então sua conversão à forma de maior atividade possível.

Regulação Alostérica

A glicogênio fosforilase também é sensível à regulação por efetuadores alostéricos: a forma *b*, encontrada no músculo em repouso, é fortemente estimulada por *AMP* (adenosina 5'-monofosfato) (Fig. 20.1). A concentração celular de AMP é habitualmente baixa, mas eleva-se durante a contração muscular, cujo grande dispêndio energético ocorre com a conversão de ATP em ADP. À medida que cresce a concentração de ADP, o equilíbrio da reação catalisada pela *adenilato quinase* (ou *mioquinase*)

$$2\,ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$$

favorece a formação de ATP, fornecendo energia adicional para o trabalho muscular, e faz aumentar a concentração de AMP. A ligação de AMP à forma *b* da glicogênio fosforilase torna-a ativa, intensificando a degradação do glicogênio. Com efeito, alguns músculos são capazes de mobilizar glicogênio, sem conversão detectável de fosforilase *b* em *a*.

Embora a regulação da glicogênio fosforilase por modificação covalente seja a mais importante e de resultados mais radicais, o conjunto das duas regulações converge todas as formas da enzima para as formas ativas.

A degradação do glicogênio libera glicose 1-fosfato[1], que, isomerizada a glicose 6-fosfato, vai ser metabolizada nas células musculares pela via glicolítica que também está estimulada. A contração muscular, por períodos curtos, é sustentada pelo ATP produzido na glicólise. É importante lembrar que a glicose proveniente da glicogenólise muscular destina-se *sempre* a uso interno, ao contrário do que acontece no fígado.

20.1.2 REGULAÇÃO DA SÍNTESE DO GLICOGÊNIO MUSCULAR

cAMP e Ca^{2+} estimulam a degradação e inibem a síntese do glicogênio muscular

Quando a degradação de glicogênio está estimulada, a síntese está inibida. Esta regulação oposta e simultânea acontece porque (1) a enzima que catalisa a glicogenólise (glicogênio fosforilase) é *ativa* na forma fosforilada, ao passo que a enzima que catalisa a glicogênese (glicogênio sintase) é *inativa* na forma fosforilada e (2) as duas enzimas são substratos da mesma cascata enzimática que determina a fosforilação de proteínas. A epinefrina, portanto, determina o estímulo da degradação e a inibição da síntese de glicogênio muscular; estes mesmos efeitos são desencadeados por íons Ca^{2+}, liberados em resposta a estímulos nervosos (Fig. 20.2).

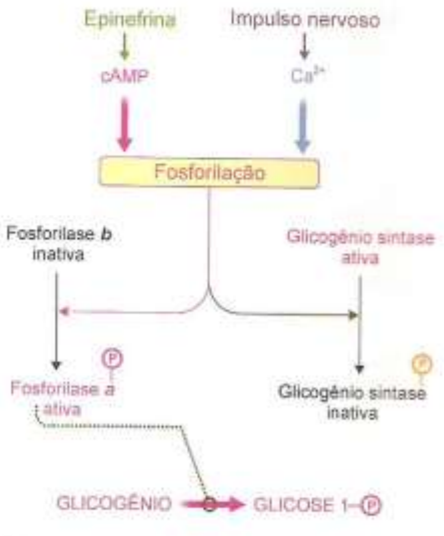


Fig. 20.2 Esquema resumindo os eventos de fosforilação provocados por epinefrina e estímulo nervoso que acarretam o estímulo da degradação e a inibição da síntese do glicogênio muscular.

[1]Cerca de 90% dos resíduos de glicose do glicogênio são removidos como glicose 1-fosfato, por fosforólise catalisada pela glicogênio fosforilase e 10% como glicose, por hidrólise promovida pela enzima desramificadora (Seção 13.1).

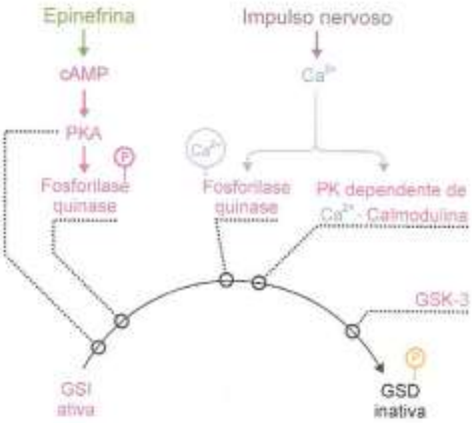


Fig. 20.3 Cascata enzimática de inibição da síntese de glicogênio muscular. A inativação da glicogênio sintase, por conversão da forma GSI em GSD, é acionada pelos mesmos sinais, hormonal e nervoso, que provocam a estimulação da glicogenólise. Neste caso, outras proteína quinases contribuem para o bloqueio da glicogênio sintase, como a proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina e a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3). As formas ativas das enzimas estão representadas em vermelho.

A regulação da síntese de glicogênio é mais complexa e menos conhecida do que a regulação da degradação. A forma fosforilada e inativa da glicogênio sintase é chamada de *glicogênio sintase **D** (GSD)*, por ser **d**ependente de glicose 6-fosfato como efetuador alostérico positivo; a forma desfosforilada e ativa é a *glicogênio sintase **I** (GSI)*, por ser ***i**ndependente* de glicose 6-fosfato. Como acontece com a glicogênio fosforilase, a regulação da glicogênio sintase por modificação covalente é a mais importante, mas a regulação alostérica pode ser significativa em algumas situações. Por exemplo, quando a fosfofrutoquinase 1 está inibida (Seção 20.2), há acúmulo de glicose 6-fosfato que ativa a GSD, promovendo a síntese de glicogênio.

A glicogênio sintase pode ser fosforilada em, pelo menos, nove resíduos de serina, pela ação de onze proteína quinases. Neste aspecto, difere da glicogênio fosforilase, que é regulada pela fosforilação de um único resíduo de serina e catalisada por uma única enzima, a fosforilase quinase. Assim, para a conversão da forma ativa, GSI, na inativa, GSD (Fig. 20.3), além das proteína quinases da cascata da degradação do glicogênio — PKA e fosforilase quinase —, são consideradas importantes a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), a proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina e a proteína quinase dependente de AMP (AMPK).

A síntese de glicogênio muscular ocorre quando as enzimas são desfosforiladas

Cessado o estímulo por epinefrina, seus efeitos metabólicos desaparecem graças à ação coordenada de um conjunto de enzimas. O quadro vigente, e que deve ser revertido para que a célula volte à situação de repouso e esteja preparada para a síntese de glicogênio, caracteriza-se por:

1. Adenilato ciclase ativada;
2. Concentração de cAMP alta;
3. Proteína quinase dependente de cAMP (PKA) ativa;
4. Enzimas da glicogenólise fosforiladas pela PKA e estimuladas; glicogênio sintase também fosforilada, porém inibida, devido à ação das diversas proteína quinases citadas.

Os eventos que ocorrem para reverter cada uma destas condições são os seguintes:

1. Graças à atividade GTPásica da subunidade α da proteína G, o GTP a ela associado é hidrolisado, sendo convertido a GDP. Esta mudança de nucleotídios diminui a afinidade da subunidade α pela adenilato ciclase e as duas se separam: a subunidade α associa-se às outras subunidades da proteína G e a adenilato ciclase fica inativa, cessando a produção de cAMP.
2. A fosfodiesterase hidrolisa o cAMP a 5'-AMP, reduzindo a concentração celular do nucleotídio cíclico.
3. Desligada do cAMP, a subunidade reguladora da PKA volta a associar-se à subunidade catalítica e a enzima torna-se inativa.
4. As enzimas fosforiladas têm seus grupos fosfato removidos por hidrólise catalisada pela fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1). Durante o tempo em que prevaleceu a ação da epinefrina, a PP-1 estava bloqueada por fosforilação provocada pela PKA e por sua ligação ao Inibidor-1, fosforilado por esta mesma quinase.

Desta forma, quando termina o estímulo de epinefrina, as condições prevalecentes não permitem que aconteçam novas fosforilações de proteínas. A mudança decisiva no sentido do metabolismo do glicogênio dá-se quando as enzimas então fosforiladas têm os seus grupos fosfato removidos, por intervenção da insulina.

A insulina promove a síntese de glicogênio

A síntese de glicogênio depende, de forma essencial, da insulina. O exato mecanismo de sua atuação apresenta ainda pontos obscuros, mas um de seus efeitos reconhecidos é causar a desfosforilação de proteínas. Este efeito, analisado na Seção 19.4, seria devido à estimulação da proteína quinase B (PKB), o componente final da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), uma das vias de transdução de sinal de insulina. PKB fosforila enzimas reguladoras, provocando mudanças em suas atividades. A glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) e a proteína quinase A (PKA) são bloqueadas, deixando de fosforilar suas proteínas-substrato (Figs. 20.1 e 20.3); da ativação da fosfodiesterase resulta queda do nível de cAMP, contribuindo para o bloqueio da PKA; da estimulação de PP-1 decorre a remoção de grupos fosfato de suas enzimas-alvo (Fig. 20.4). Todas estas alterações fazem predominar as formas enzimáticas desprovidas de grupos fosfato, inativas no caso das enzimas responsáveis pela degradação do glicogênio, e a forma ativa da glicogênio sintase (GSI). A insulina também promove a síntese da glicogênio sintase.

Para que a glicogênese possa ser levada a cabo, é obviamente necessário que, além da adequação das atividades enzimáticas, haja disponibilidade do substrato precursor, a glicose. As fibras musculares são insulino-dependentes, ou seja, só podem receber glicose quando, em virtude de glicemia elevada, o pâncreas libera insulina. Isto é o que ocorre após as refeições, permitindo que a maior parte da glicose plasmática seja captada e convertida a glicogênio, já que, nesta situação, o transporte de glicose é estimulado e as regulações das enzimas relacionadas ao metabolismo do glicogênio inibem sua degradação e ativam sua síntese.

20.1.3 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO

A regulação do metabolismo do glicogênio hepático é semelhante à do muscular

No fígado, o metabolismo do glicogênio é regulado pelas mesmas cascatas de reações descritas para o músculo, que resultam em ativação da glicogenólise e inibição da glicogênese. Neste caso, entretanto, o principal estímulo hormonal

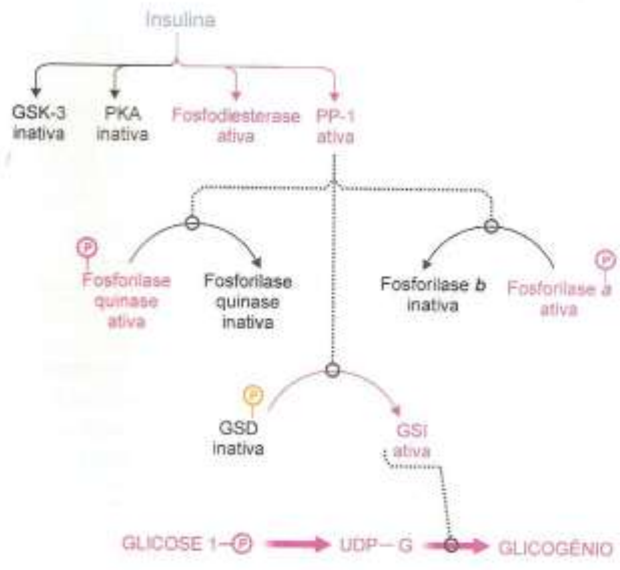


Fig. 20.4 Desfosforilação de enzimas do metabolismo do glicogênio muscular, determinada por insulina. Grupos fosfato deixam de ser adicionados ou passam a ser hidrolisados, devido a mudanças na atividade das enzimas: glicogênio fosforilase quinase 3 (GSK-3), proteína quinase A (PKA), fosfodiesterase de cAMP e fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1), descritas no texto. As enzimas envolvidas na degradação do glicogênio param de atuar e a glicogênio sintase é convertida à forma ativa (GSI), podendo catalisar a síntese de glicogênio.

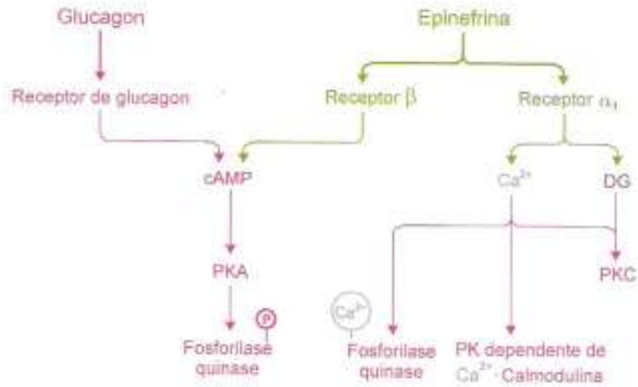


Fig. 20.5 Regulação do metabolismo do glicogênio hepático por glucagon e epinefrina. A interação dos hormônios com seus receptores na membrana plasmática dos hepatócitos (receptores β da epinefrina) ativa a via da proteína quinase A (PKA), que tem cAMP como segundo mensageiro; PKA, então, fosforila e estimula a fosforilase quinase. A epinefrina também se liga a receptores α_1, acionando a via da fosfolipase C. Os segundos mensageiros desta via, íons Ca^{2+} e 1,2-diacilglicerol (DG) estimulam a fosforilase quinase, a proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina e a proteína quinase C (PKC). A ativação dos três receptores hormonais tem como conseqüência promover a degradação, além de inibir a síntese do glicogênio.

é provocado por glucagon. A lógica funcional de o principal estímulo da degradação do glicogênio muscular e hepático ser determinado por hormônios diferentes está no destino da glicose resultante da degradação. No músculo, a glicose é destinada à glicólise e, portanto, à obtenção de ATP pelo próprio músculo. No fígado, onde a glicogenólise é provocada por glucagon, a glicose é exportada para corrigir a hipoglicemia que assinalou a liberação de glucagon.

A epinefrina também atua sobre o metabolismo do glicogênio hepático, embora este controle seja secundário em relação àquele exercido por glucagon. Os efeitos da epinefrina são mediados por sua ligação a *receptores β* — com ativação da via de sinalização da PKA, à semelhança do que ocorre no músculo — e a *receptores α_1*, com estimulação da via da fosfolipase C (Fig. 20.5). Dois segundos mensageiros desta via, íons Ca^{2+} e 1,2-diacilglicerol (DG), ativam a glicogênio fosforilase quinase, a proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina e a proteína quinase C. Essas quinases fosforilam e estimulam a glicogênio fosforilase e, coadjuvadas pela glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), fosforilam e inibem a glicogênio sintase.

A síntese do glicogênio hepático, assim como a de músculo, é promovida por insulina. Apesar de a insulina não interferir no transporte de glicose através da membrana do hepatócito, a captação de glicose é aumentada indiretamente porque a insulina induz a síntese de glicoquinase, a enzima responsável pela fosforilação da glicose no fígado. É a fosforilação do açúcar que garante a sua permanência na célula e possibilita sua utilização.

A própria glicose exerce um papel regulador sobre o metabolismo do glicogênio hepático. Quando sua concentração nos hepatócitos aumenta, refletindo o aumento de sua concentração plasmática, a glicose liga-se à glicogênio fosforilase *a*, tornando-a mais sensível à ação da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1). Desfosforilada, ou seja, na forma *b*, a glicogênio fosforilase é inativa. Adicionalmente, a isoenzima hepática da PP-1, diferentemente daquela de músculo, não é regulada por fosforilação: é inibida alostericamente por ligação, à sua subunidade R, da glicogênio fosforilase *a*; a conversão da fosforilase à forma *b* resulta na liberação da PP-1, que pode, então, desfosforilar e ativar a glicogênio sintase. Deste modo, a glicose contribui para que o glicogênio seja sintetizado em vez de degradado.

A glicose 1-fosfato obtida da degradação do glicogênio é quase sempre isomerizada a glicose 6-fosfato. Este açúcar, no fígado, é hidrolisado a glicose, que é liberada na circulação. Como será visto na seção seguinte, nas situações em que a glicogenólise hepática ocorre, a glicose 6-fosfato não pode ser metabolizada pela glicólise, porque esta via está inibida.

20.2 REGULAÇÃO DA GLICÓLISE E DA GLICONEOGÊNESE

A glicólise é encontrada em todas as células de mamíferos. No fígado, e com menor importância no córtex renal, processa-se também a gliconeogênese, uma via que, de forma geral, é antagônica à glicólise. Nestes órgãos, a regulação das duas vias é feita de forma inversa, isto é, quando uma delas está ativa, a outra está desacelerada. Uma

vez que a glicólise e a gliconeogênese compartilham várias enzimas, a regulação diferencial só pode ser exercida nas etapas em que as vias diferem, incidindo sobre enzimas que pertencem a uma só das vias. Há, portanto, três sítios de controle: as conversões entre (1) glicose e glicose 6-fosfato; (2) frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato; (3) fosfoenolpiruvato e piruvato. Deve-se notar que as enzimas-alvo da regulação de ambas as vias catalisam reações irreversíveis: na glicólise, as reações catalisadas por glicoquinase, fosfofrutoquinase 1 e piruvato quinase; na gliconeogênese, a etapa inicial, catalisada pela piruvato carboxilase juntamente com a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, e as reações catalisadas por frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase. A próxima tabela resume os controles opostos das duas vias.

Sítios de controle da glicólise e gliconeogênese (Etapas diferentes nas duas vias)	**Enzimas-alvo da regulação (Reações irreversíveis)**	
Conversão entre:	**Glicólise**	**Gliconeogênese**
1) Glicose e glicose 6-fosfato	Glicoquinase	Glicose 6-fosfatase
2) Frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato	Fosfofrutoquinase 1	Frutose 1,6-bisfosfatase
3) Fosfoenolpiruvato e piruvato	Piruvato quinase	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase Piruvato carboxilase

Segue-se a análise dos três sítios de controle e da modulação da concentração das enzimas da glicólise e da gliconeogênese *no fígado*, o principal órgão responsável pela gliconeogênese.

1) Primeiro sítio de controle: glicoquinase e glicose 6-fosfatase.

A primeira reação da glicólise

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$

é catalisada pelas *hexoquinases I* a *III* na maioria dos tecidos de mamíferos. As três isoenzimas exibem cinética *michaeliana* típica (Fig. 20.6) e alta afinidade por glicose, com valores de K_M inferiores a 0,1 mM. Como o intervalo fisiológico de flutuação da concentração de glicose plasmática é de 5 a 8 mM, estas hexoquinases funcionam sempre em velocidade máxima ($V_{máx}$). Ou seja, a velocidade da reação que catalisam independe do valor da glicemia, assegurando um suprimento constante de glicose para células estritamente dependentes deste açúcar, como as do cérebro e hemácias, e também para outros tecidos como o muscular, o adiposo etc. Um outro mecanismo de regulação permite ajustar a captação de glicose pelo tecido à sua utilização — o produto da reação, *glicose 6-fosfato*,

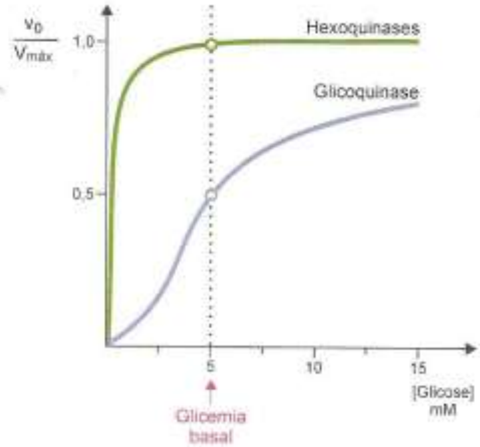


Fig. 20.6 Curvas de saturação com glicose para as hexoquinases I a III e para a glicoquinase. Em valores próximos da concentração basal de glicose plasmática (5 mM), as hexoquinases funcionam em velocidade constante, ao passo que a glicoquinase é capaz de catalisar a reação em velocidades proporcionais às variações da glicemia. Para possibilitar a comparação entre os dois tipos de enzimas, o gráfico mostra as velocidades relativas da reação, expressas como $v_0/V_{máx}$. As velocidades propiciadas pelas hexoquinases são muito menores (valores maiores de $v_0/V_{máx}$) do que as conseguidas com a glicoquinase (valores menores de $v_0/V_{máx}$), mas, em conseqüência do baixo valor de K_M das hexoquinases, suas velocidades máximas são atingidas com baixa concentração de glicose.

é um potente inibidor das hexoquinases I-III. Quando a utilização da glicose 6-fosfato diminui, sua concentração aumenta e as hexoquinases ficam momentaneamente inibidas, limitando a fosforilação da glicose. Assim, no período absortivo, quando o nível de insulina é alto, as fibras musculares recebem glicose (GLUT 4, o transportador de glicose nestas células é estimulado por insulina) e utilizam-na para obtenção de ATP e para síntese de glicogênio. Saturados os estoques de glicogênio, a utilização da glicose 6-fosfato diminui, restringindo a retenção de glicose plasmática.

No fígado, a situação é diferente, pela presença da *hexoquinase IV* ou *glicoquinase*[2]. Embora promovendo a mesma reação, esta isoenzima tem propriedades cinéticas diferentes das outras hexoquinases e, até mesmo, excêntricas. Apesar de ser uma enzima monomérica, a glicoquinase exibe cooperatividade na ligação com o substrato, refletida em uma curva sigmóide de saturação com glicose (Fig. 20.6), à semelhança das enzimas alostéricas, que são oligoméricas. A concentração de glicose que estabelece a metade da $V_{máx}$ da reação catalisada pela glicoquinase — designada $K_{0,5}$ ou $S_{0,5}$ em vez de K_M, por não obedecer à cinética de Michaelis-Menten — é cerca de 5 mM, próxima da glicemia de jejum e 50 vezes maior do que o K_M das outras hexoquinases. A glicoquinase tem, portanto, afinidade muito menor pela glicose do que as outras hexoquinases. Difere ainda destas enzimas, por não ser inibida pela glicose 6-fosfato.

A importância do valor de $K_{0,5}$ da glicoquinase é adaptar rigorosamente sua atividade à glicemia, pois aumentos do nível sangüíneo de glicose levam a aumentos significativos da velocidade da reação. É o que acontece após a ingestão de uma refeição: a maior velocidade da reação da glicoquinase permite converter o excedente de glicose em glicogênio, armazenado no fígado, e em triacilgliceróis, estocados no tecido adiposo. Nesta situação, também se eleva a velocidade do transporte por GLUT 2, possibilitando a entrada de glicose nos hepatócitos. Por outro lado, quando há redução da glicemia, a baixa afinidade da glicoquinase pelo açúcar limita sua tomada pelo fígado, deixando-o disponível para os tecidos que dele não podem prescindir.

Quando a concentração plasmática de glicose é baixa, a atuação da glicoquinase é restringida, não somente devido à sua baixa afinidade pelo substrato, mas também porque a enzima é bloqueada por uma *proteína reguladora*. Esta proteína altera a atividade da glicoquinase e a sua localização subcelular. A proteína reguladora localiza-se no núcleo do hepatócito, para onde seqüestra a glicoquinase, com a qual forma um complexo inativo. Na presença de altos níveis de glicose, a afinidade da proteína reguladora pela glicoquinase diminui, o complexo é desfeito e a glicoquinase passa para o citossol, onde pode catalisar a fosforilação da glicose. Por outro lado, a frutose 6-fosfato promove a formação do complexo nuclear inativo. O acúmulo de frutose 6-fosfato sinaliza interrupção da glicólise em etapas posteriores, coadunando-se com a inibição da glicoquinase. O glucagon, liberado na hipoglicemia, bloqueia a mobilização da enzima para o citossol. Portanto, a glicoquinase transita entre o citossol e o núcleo dependendo da disponibilidade de substrato e das condições hormonais vigentes. Em resumo, as propriedades da glicoquinase, aliadas às de GLUT 2, capacitam o fígado a fazer ajustes na glicemia e utilizar a glicose apenas quando ela é abundante.

A etapa contrária à fosforilação da glicose nos hepatócitos é catalisada pela *glicose 6-fosfatase*, uma enzima da gliconeogênese:

$$\text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \rightarrow \text{Glicose} + P_i$$

O valor do K_M da glicose 6-fosfatase é muito maior do que a concentração basal de glicose 6-fosfato nos hepatócitos, de modo que sua atividade é proporcional ao conteúdo intracelular de seu substrato. A produção de glicose 6-fosfato aumenta em virtude do estímulo da glicogenólise e da gliconeogênese no jejum, quando, então, a atuação da glicose 6-fosfatase é decisiva para a exportação de glicose do fígado para outros órgãos; nesta condição, a via glicolítica encontra-se inibida. Nenhuma regulação alostérica é conhecida para a glicose 6-fosfatase; o controle existe no nível da transcrição.

2) Segundo sítio de controle: fosfofrutoquinase 1 e frutose 1,6-bisfosfatase.

A conversão de frutose 6-fosfato a frutose 1,6-bisfosfato é promovida pela *fosfofrutoquinase 1* na glicólise e a transformação oposta, na gliconeogênese, pela *frutose 1,6-bisfosfatase* (Fig. 20.7 a). Estas reações compõem a etapa mais

[2]A *hexoquinase IV*, a isoenzima predominante em hepatócios e células β do pâncreas, é inadequadamente chamada de *glicoquinase*, já que não é específica para glicose. Porém, devido ao seu uso consagrado, esta segunda denominação será mantida neste texto.

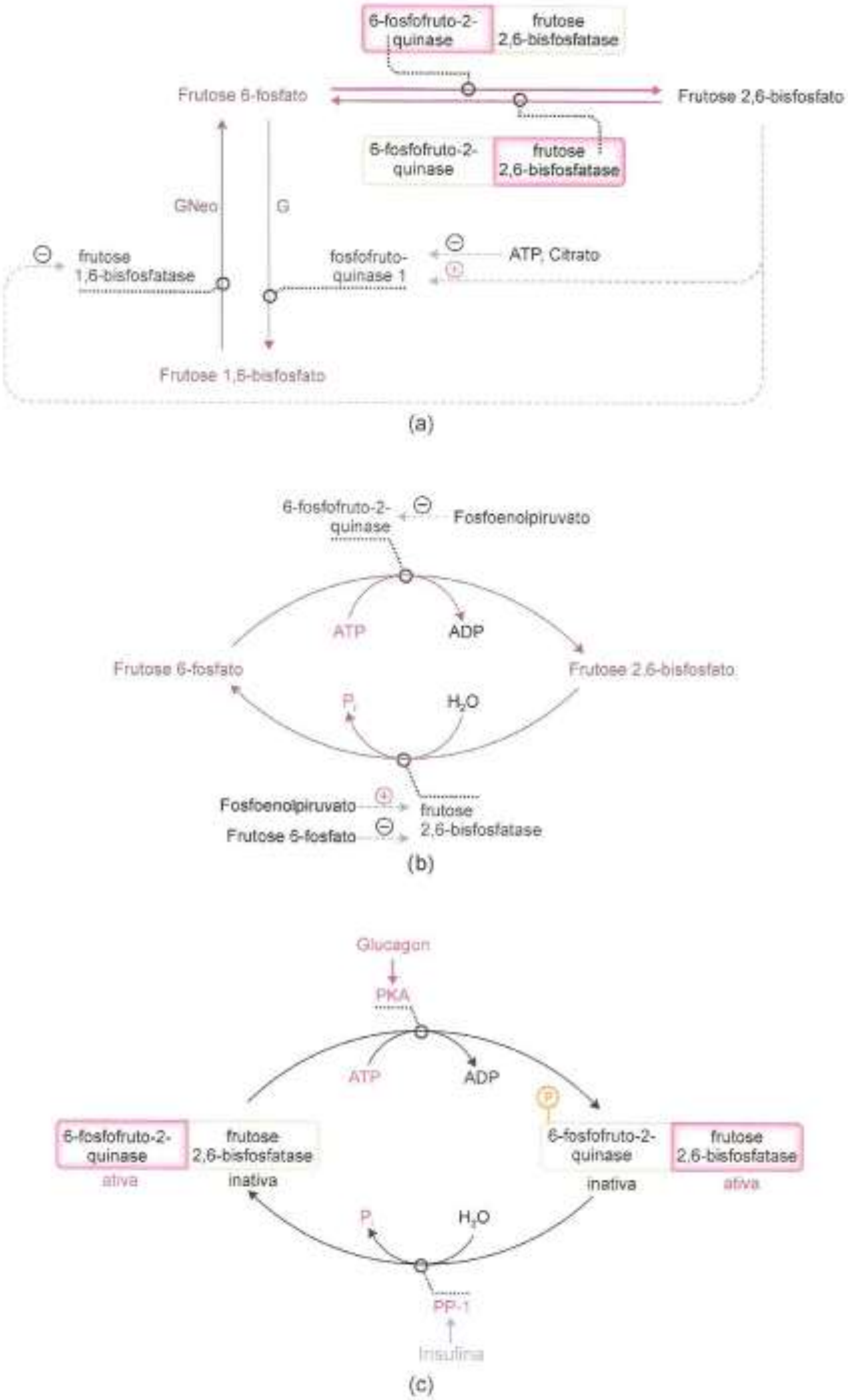


Fig. 20.7 Segundo sítio de controle da glicólise/gliconeogênese: interconversão de frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato. a) Regulação alostérica da fosfofrutoquinase 1, a enzima da glicólise (G), e da frutose 1,6-bisfosfatase, da gliconeogênese (GNeo): a primeira é ativada por frutose 2,6-bisfosfato e a segunda é inibida. A 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase está representada por um retângulo contendo os domínios com atividade de quinase e de fosfatase. A fosfofrutoquinase 1 é ainda inibida por ATP e citrato. As setas tracejadas azuis indicam regulações alostéricas, positivas (+) e negativas (−). b) Regulação alostérica da formação e da hidrólise de frutose 2,6-bisfosfato catalisadas pelas atividades de 6-fosfofruto-2-quinase e de frutose 2,6-bisfosfatase da enzima bifuncional. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-}). c) Regulação por modificação covalente da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase. A fosforilação da enzima pela PKA, estimulada por glucagon, ativa a fosfatase; a hidrólise do grupo fosfato pela PP-1, sob ação de insulina, ativa a quinase. (P) = grupo fosfato (PO_3^{2-}).

importante e a mais complexa da regulação das duas vias. A seguir, estão indicados os principais efetuadores alostéricos das duas enzimas.

Enzimas	Efetuadores alostéricos	
	Negativos	Positivos
Fosfofrutoquinase 1	ATP; Citrato	AMP[1]; Frutose 2,6-bisfosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 2,6-bisfosfato	

[1]Em músculos esqueléticos.

A inibição da fosfofrutoquinase 1, também chamada *6-fosfofruto-1-quinase*, por *ATP* representa uma situação clássica de regulação por *feedback* ou retroinibição, em que um produto final da via regula sua velocidade. A inibição por *citrato* permite adequar a intensidade da glicólise à do ciclo de Krebs: se o suprimento de substratos para o ciclo ultrapassa sua capacidade de utilizá-los, acumula-se citrato que, difundindo-se para o citossol, inibe a fosfofrutoquinase 1.

A ativação da fosfofrutoquinase 1 por *AMP* é particularmente importante no caso de músculos esqueléticos em contração vigorosa, quando aumenta a concentração de AMP. Nesta situação, também cresce a disponibilidade de substrato para a glicólise, por duas razões: a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) promove a migração de GLUT 4 para a superfície celular, o que faz aumentar o transporte de glicose plasmática; o metabolismo do glicogênio está regulado no sentido degradativo, fornecendo glicose intracelularmente. A conseqüência é uma aceleração da glicólise, com produção de grande quantidade de NADH. O aporte de oxigênio para o músculo é de início insuficiente para permitir a oxidação de NADH pela cadeia de transporte de elétrons. Resulta um aumento da concentração de NADH mitocondrial, que acaba por refletir-se no citossol, pois há pouco NAD^+ na mitocôndria para ser usado pelo sistema de lançadeira para oxidar o NADH citossólico. Este é, então, oxidado na reação catalisada pela *lactato desidrogenase*, que reduz piruvato a lactato. O NAD^+ assim produzido permite o prosseguimento da glicólise anaeróbia, gerando ATP para sustentar a contração muscular. O lactato é captado pelo fígado, que é capaz de convertê-lo a glicose. Esta, uma vez na circulação, pode ser aproveitada pelas células musculares, onde o seu transporte está estimulado.

A *frutose 2,6-bisfosfato* é o efetuador alostérico mais potente na ativação da fosfofrutoquinase 1 e na inibição da frutose 1,6-bisfosfatase no fígado. O controle da atividade da glicólise e da gliconeogênese vai depender da concentração desta forma bisfosforilada da frutose. Sendo assim, sua própria produção está sob controle estrito.

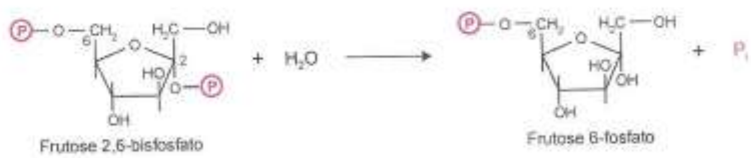
A produção de frutose 2,6-bisfosfato é submetida a controle alostérico e hormonal

O conteúdo celular de frutose 2,6-bisfosfato está na dependência de duas ações catalíticas — quinase e fosfatase —, presentes em domínios diferentes de uma mesma enzima bifuncional, chamada *6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase*. A atividade de quinase é, às vezes, denominada *fosfofrutoquinase 2*, para distingui-la da fosfofrutoquinase 1. As duas fosfofrutoquinases são relacionadas: a fosfofrutoquinase 1, que catalisa a produção de um intermediário da glicólise, a frutose 1,6-bisfosfato, é ativada alostericamente pelo produto da reação da fosfofrutoquinase 2, a frutose 2,6-bisfosfato.

A frutose 2,6-bisfosfato é produzida pela seguinte reação, catalisada pela *6-fosfofruto-2-quinase* da enzima bifuncional:



A frutose 2,6-bisfosfato, além de não ser um intermediário da glicólise, não segue qualquer via metabólica conhecida. A única alternativa para diminuir sua concentração é a hidrólise do grupo 2-fosfato, com regeneração de frutose 6-fosfato, catalisada pela *frutose 2,6-bisfosfatase* da enzima bifuncional:



Frutose 2,6-bisfosfato   Frutose 6-fosfato

Assim, quando a atividade de 6-fosfofruto-2-quinase está favorecida, aumenta a concentração de frutose 2,6-bisfosfato; o oposto ocorre quando prevalece a ação de frutose 2,6-bisfosfatase. Como já citado, a frutose 2,6-bisfosfato ativa fortemente a fosfofrutoquinase 1 e inibe a frutose 1,6-bisfosfatase, favorecendo, portanto, a glicólise e restringindo a gliconeogênese (Fig. 20.7 a).

A 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, responsável pelo nível de frutose 2,6-bisfosfato, está submetida a controle alostérico e por modificação covalente.

A regulação alostérica da enzima bifuncional está mostrada na tabela a seguir e na Fig. 20.7 b.

	Efetuadores alostéricos	
Atividades da enzima bifuncional	Negativos	Positivos
6-Fosfofruto-2-quinase	Fosfoenolpiruvato	—
Frutose 2,6-bisfosfatase	Frutose 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato

Deste modo, o teor de frutose 2,6-bisfosfato depende diretamente do nível de frutose 6-fosfato e inversamente do nível de fosfoenolpiruvato. O aumento da concentração de *fosfoenolpiruvato* indica (1) que este composto não está sendo utilizado pela piruvato quinase ou (2) que está sendo produzido pela gliconeogênese. Em qualquer dos dois casos, os seus efeitos sobre as atividades da enzima bifuncional levam à queda da concentração de frutose 2,6-bisfosfato, diminuindo a velocidade da glicólise e abrindo caminho para que se complete a gliconeogênese. Por outro lado, altos níveis de *frutose 6-fosfato* decorrem de altos níveis de glicose — o acúmulo de frutose 6-fosfato assinala a necessidade de sua utilização pela glicólise e impede a síntese de glicose quando este açúcar está disponível. Isto é obtido pelo bloqueio exercido pela frutose 6-fosfato sobre a frutose 2,6-bisfosfatase: a concentração de frutose 2,6-bisfosfato aumenta, estimulando a fosfofrutoquinase 1 e a oxidação da glicose, e inibindo a frutose 1,6-bisfosfatase e a produção de glicose.

O predomínio de uma das duas atividades da enzima bifuncional depende também de regulação por modificação covalente, mediada por hormônios: a enzima é substrato da proteína quinase A (PKA). Quando um dos resíduos de serina da enzima hepática é fosforilado, o sítio ativo responsável pela síntese de frutose 2,6-bisfosfato é inibido e aquele responsável pela sua degradação é estimulado; quando a enzima bifuncional é desfosforilada, a atividade exercida é a de quinase (Fig. 20.7 c). Sob estímulo de glucagon, principalmente, e de epinefrina, a via de transdução de sinal da PKA é acionada, a enzima bifuncional é fosforilada e sua atividade de fosfatase faz reduzir a concentração de frutose 2,6-bisfosfato. Por conseqüência, a fosfofrutoquinase 1 fica inativa, impedindo a glicólise, e a frutose 1,6-bisfosfatase tem sua atividade restabelecida, levando ao estímulo da gliconeogênese.

Em períodos de jejum, o glucagon estimula a degradação do glicogênio hepático, com produção de glicose 1-fosfato, que é isomerizada a glicose 6-fosfato. À medida que se prolonga o jejum e vai sendo esgotado o depósito de glicogênio hepático, aumenta a importância da gliconeogênese para a produção de glicose. O fluxo gliconeogênico soma-se à degradação do glicogênio, aumentando a produção de glicose 6-fosfato. Como nesta situação a glicólise está inibida, o destino da glicose 6-fosfato é ser convertida a glicose e exportada do fígado, contribuindo para a correção da baixa glicemia que originou a liberação do glucagon.

A insulina, liberada em hiperglicemia, tem efeito oposto ao glucagon e à epinefrina. Por intermédio de diversos mecanismos, a insulina promove a desfosforilação da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, que passa a exibir apenas a atividade de quinase. Os níveis de frutose 2,6-bisfosfato aumentam, ativando a fosfofrutoquinase 1 e inibindo a frutose 1,6-bisfosfatase, ou seja, a glicólise é ativada e a gliconeogênese é bloqueada, frente a situações de grande oferta de glicose, como após as refeições.

No músculo cardíaco, a degradação de glicogênio é concomitante com a ativação da glicólise

A descrição dos efeitos da frutose 2,6-bisfosfato no fígado mostra que, em presença de glucagon e epinefrina, sua concentração diminui, impedindo a glicólise. Em decorrência, o glicogênio hepático nunca é utilizado pelo próprio hepatócito, destinando-se sempre à manutenção da glicemia. No músculo cardíaco, a situação é oposta: o glicogênio é sempre utilizado pelas próprias fibras musculares, porque quando sua degradação está estimulada, a via glicolítica também está.

A diferença das regulações reside na 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase. A fosforilação da isoenzima bifuncional de músculo cardíaco pela PKA ocorre em um resíduo de serina diferente, que ativa a 6-fosfofruto-2-quinase, em vez de inibir, como ocorre com a isoenzima hepática. De tal sorte que, quando o glicogênio está sendo degradado, a concentração de frutose 2,6-bisfosfato aumenta, estimulando a fosfofrutoquinase 1 e, portanto, a glicólise. Esta ativação responde à liberação de epinefrina, que sinaliza a necessidade de produção de ATP para sustentar o trabalho muscular. Na isquemia (fluxo sangüíneo deficiente em uma área tecidual), o déficit de oxigênio impede o prosseguimento da fosforilação oxidativa, e a síntese de ATP é reduzida, acarretando aumento na concentração de AMP. A conseqüência é a estimulação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) que fosforila a enzima bifuncional, coadjuvando o efeito da PKA.

3) Terceiro sítio de controle: piruvato quinase e piruvato carboxilase + fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

A regulação do terceiro sítio incide especialmente sobre a *piruvato quinase* (Fig. 20.8).

O efetuador alostérico positivo da piruvato quinase é a *frutose 1,6-bisfosfato*. Assim, quando a regulação da fosfofrutoquinase 1 estabelece uma alta atividade para esta enzima, seu produto, a frutose 1,6-bisfosfato, estimula a piruvato quinase, "preparando-a" para receber o fluxo de substratos da via glicolítica. A piruvato quinase hepática é inibida por *alanina*. Esta regulação é fundamental durante períodos prolongados de jejum, quando o fígado recebe quantidades apreciáveis de alanina, uma das formas de transporte dos aminoácidos provenientes do catabolismo de proteínas musculares. A alanina é um composto gliconeogênico e, para a síntese de glicose, deve sofrer transami-

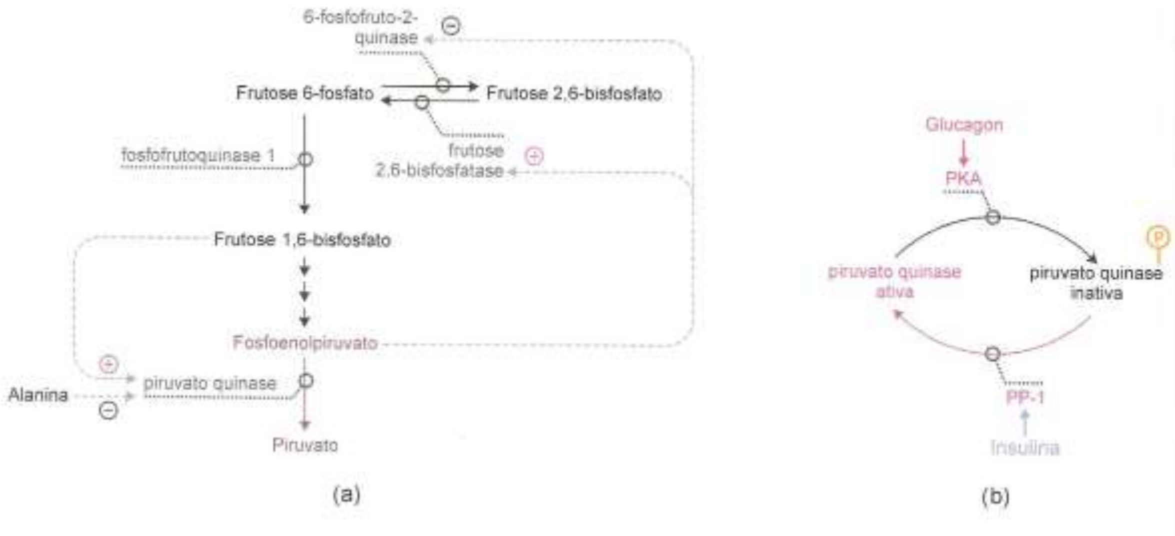


Fig. 20.8 Terceiro sítio de controle da glicólise/gliconeogênese: piruvato quinase. a) Regulação alostérica. A enzima é estimulada por frutose 1,6-bisfosfato, cuja produção cresce com a disponibilidade de glicose; é inibida por alanina e, neste caso, o fosfoenolpiruvato inibe a formação de frutose 2,6-bisfosfato, o principal ativador da fosfofrutoquinase 1: a glicólise é desacelerada e a gliconeogênese, favorecida. b) Regulação por modificação covalente. Sob estímulo de glucagon, a piruvato quinase é fosforilada pela proteína quinase A (PKA), tornando-se inativa e favorecendo a gliconeogênese; na presença de insulina, a remoção de grupo fosfato pela fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1) ativa a enzima, propiciando o consumo de glicose pela glicólise.

nação, originando piruvato. O piruvato é transformado em oxaloacetato e este, em fosfoenolpiruvato, que segue a via gliconeogênica. A inibição da piruvato quinase por alanina impede que o fosfoenolpiruvato formado possa ser reconvertido a piruvato.

A piruvato quinase também sofre modificação covalente: a fosforilação converte a forma ativa em inativa. No jejum, o glucagon estimula a via da PKA e esta inativação se processa, aumentando a concentração de *fosfoenolpiruvato*. Como descrito no segundo sítio de controle da glicólise/gliconeogênese, este composto atua como efetuador alostérico da enzima bifuncional, inibindo sua atividade de quinase e estimulando a de fosfatase. Decresce, portanto, a concentração de frutose 2,6-bisfosfato, cessando o estímulo sobre a fosfofrutoquinase 1 e o bloqueio da frutose 1,6-bisfosfatase. As conseqüências são a interrupção da via glicolítica e a ativação simultânea da gliconeogênese. Em hiperglicemia, sob ação da insulina, a piruvato quinase é desfosforilada pela proteína fosfatase 1 (PP-1), tornando-se ativa — o sentido das regulações é invertido.

O controle alostérico da piruvato carboxilase está descrito na Seção 20.5. Em relação à fosfoenolpiruvato carboxiquinase, não foram identificados efetuadores alostéricos.

4) Modulação da concentração de enzimas da glicólise e da gliconeogênese.

Um outro mecanismo decisivo de regulação da glicólise e da gliconeogênese incide sobre o conteúdo enzimático celular, exercido por ação hormonal.

A expressão dos genes estruturais da piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase é induzida por glucagon, glicocorticóides ou catecolaminas. O glucagon inibe também a transcrição dos genes da glicoquinase, da fosfofrutoquinase 1 e da piruvato quinase. No jejum e no diabetes, quando prevalece a ação de glucagon, a concentração de glicoquinase cai 50% e os níveis das enzimas da gliconeogênese aumentam três vezes, em média. Uma outra ação do glucagon, já mencionada, é impedir a translocação, e a conseqüente estimulação, da glicoquinase do núcleo para o citossol. O resultado é a aceleração da gliconeogênese e a desaceleração da glicólise.

No período absortivo, a insulina estimula a síntese de glicoquinase e piruvato quinase, que têm suas concentrações elevadas em torno de cinco vezes, e reprime a produção das enzimas gliconeogênicas induzidas por glucagon, provavelmente por ativação da via de transdução de sinal da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K).

A regulação da gliconeogênese hepática é fundamental para o ajuste da glicemia. A insulina é o mais importante hormônio inibidor da via — no diabetes tipo 2, caracterizado por resistência à insulina e/ou por secreção deficiente do hormônio, a produção de glicose pelo fígado é drasticamente aumentada. Os mecanismos sinalizadores que medeiam a regulação das enzimas gliconeogênicas e glicolíticas têm interesse particular, por constituírem alvos de intervenção farmacológica para restaurar a sensibilidade à insulina.

20.3 REGULAÇÃO DA VIA DAS PENTOSES FOSFATO

Os produtos principais da via das pentoses fosfato são NADPH e ribose 5-fosfato. A pentose fosfato é precursora da síntese de nucleotídios; NADPH é a coenzima redutora das sínteses de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteróides, e de reações de dissipação de radicais livres. As desidrogenases da parte oxidativa da via das pentoses fosfato que convertem $NADP^+$ a NADPH são inibidas competitivamente por NADPH. O bloqueio é abolido por oxidação de NADPH a $NADP^+$ pelos processos citados. As sínteses redutoras ocorrem intensamente no fígado, tecido adiposo etc., e os mecanismos antioxidantes, nas hemácias.

O destino da glicose 6-fosfato — via das pentoses fosfato ou glicólise — está subordinado às razões ATP/ADP e $NADPH/NADP^+$ intracelulares. Quando a razão ATP/ADP é baixa (carga energética celular baixa), a glicose é degradada pela via glicolítica, produzindo ATP, pois, nestas condições, a glicólise está estimulada pelos processos reguladores já descritos; não ocorre síntese de ácidos graxos e a razão $NADPH/NADP^+$ é alta, inibindo a via das pentoses fosfato. Se a razão ATP/ADP elevar-se, a fosfofrutoquinase 1 da glicólise é inibida e a síntese de ácidos graxos, favorecida, consumindo NADPH e eliminando a inibição das desidrogenases da via das pentoses fosfato: o metabolismo da glicose 6-fosfato passa a ser desviado para esta via. A formação de ácidos graxos também consome ATP, de modo que, à medida que a razão ATP/ADP diminui, a glicólise volta a ocorrer até que a concentração de ATP aumente, a via seja desacelerada e assim por diante. Deste modo, as velocidades das duas vias oscilam alternadamente, em resposta às razões ATP/ADP e $NADPH/NADP^+$ vigentes. O significado fisiológico deste "desvio" intermitente é propiciar a obtenção de NADPH, mantendo o fluxo dos carbonos precursores de ácidos graxos, originários da glicose.

A ocorrência da via das pentoses fosfato está associada a condições fisiológicas em que predominam processos de síntese. Quando as taxas glicêmicas são altas, os níveis elevados de insulina resultantes acarretam, no tecido adiposo, aumento da permeabilidade à glicose e, no fígado, da produção de glicoquinase. Tais condições propiciam a síntese de ácidos graxos, que também é estimulada por insulina.

As partes oxidativa e não-oxidativa da via das pentoses fosfato podem ser acionadas separadamente

A existência de intermediários comuns — glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato — na glicólise e na via das pentoses fosfato, somada à reversibilidade das reações catalisadas por transaldolases e transcetolases, permite uma grande flexibilidade no metabolismo da glicose. De fato, é possível haver adaptações não só às necessidades celulares de ATP, mas também à produção diferencial de NADPH e ribose 5-fosfato, sem que nenhum dos dois compostos seja acumulado. Considerem-se os seguintes exemplos, nos quais:

1. são necessários NADPH e ribose 5-fosfato simultaneamente — há predomínio da parte oxidativa da via.
2. a demanda de ribose 5-fosfato é maior do que a de NADPH — a parte não-oxidativa é acionada. As reações das transaldolases e transcetolases convertem frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, produzidos pela glicólise, em ribose 5-fosfato. Esta é a situação vigente na maioria dos tecidos, músculos, por exemplo, que devem produzir ribose 5-fosfato para a síntese de nucleotídios, mas não se encarregam das sínteses redutoras já citadas.
3. a necessidade de NADPH, para produção de ácidos graxos, por exemplo, é maior do que a de ribose 5-fosfato — a ribulose 5-fosfato produzida na parte oxidativa é convertida a gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato pela etapa não oxidativa. A frutose 6-fosfato pode retornar à via das pentoses fosfato após sua conversão a glicose 6-fosfato pela fosfoglicoisomerase ou ganhar a via glicolítica. A maior parte do gliceraldeído 3-fosfato é reconduzido à glicólise e, posteriormente, convertido em acetil-CoA e em ácidos graxos; o restante origina glicerol 3-fosfato, necessário para a esterificação dos ácidos graxos sintetizados, formando triacilgliceróis.

20.4 REGULAÇÃO DO COMPLEXO PIRUVATO DESIDROGENASE

O piruvato tem vários destinos possíveis: ser totalmente oxidado a CO_2 (via acetil-CoA e ciclo de Krebs), ser reduzido a lactato ou ser utilizado como precursor na síntese de lipídios (via acetil-CoA), de carboidratos (gliconeogênese) e de aminoácidos (transaminação). A ação do *complexo piruvato desidrogenase*, transformando piruvato em acetil-CoA, limita os destinos do piruvato: a acetil-CoA só pode ser oxidada ou convertida a lipídios e, em situações particulares, a corpos cetônicos. O complexo enzimático, portanto, conecta a glicólise ao ciclo de Krebs e à síntese de lipídios, desempenhando papel estratégico no controle da utilização de glicose como fonte de energia ou como substrato precursor na biossíntese de ácidos graxos e colesterol.

O complexo piruvato desidrogenase de mamíferos contém, além das três enzimas que catalisam a oxidação de piruvato a acetil-CoA, duas enzimas reguladoras específicas, a *piruvato desidrogenase quinase* e a *piruvato desidrogenase fosfatase*. Quando fosforilado pela quinase, o complexo torna-se inativo; a remoção do grupo fosfato pela fosfatase reativa o complexo (Fig. 20.9). Foram descritas quatro isoenzimas da piruvato desidrogenase quinase, PDK 1 a 4, e duas da piruvato desidrogenase fosfatase, PDP 1 e 2, que diferem quanto à expressão nos tecidos e propriedades cinéticas e de regulação. A isoenzima considerada mais importante para a regulação da piruvato desidrogenase é a PDK 4, que é especialmente abundante em músculos esqueléticos e cardíaco e no fígado.

Os mecanismos de regulação a curto prazo das piruvato desidrogenase quinases incluem ativação alostérica por acetil-CoA e NADH, produtos da reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase e da β-oxidação de ácidos graxos, e inibição por piruvato, o substrato do complexo. As razões acetil-CoA/CoA e $NADH/NAD^+$ mitocondriais aumentam quando há intensa oxidação de ácidos graxos, como acontece no jejum e no exercício prolongado, estimulando grandemente a atividade da PDK 4. Adicionalmente, no jejum, o efetuador alostérico negativo da PDK 4, o piruvato, é escasso e a enzima, por razões ainda não esclarecidas, torna-se menos sensível à inibição por esse composto. O complexo piruvato desidrogenase fica inoperante, bloqueando a oxidação de glicose.

O controle a longo prazo envolve a indução das piruvato desidrogenase quinases, em especial da PDK 4, e a repressão das piruvato desidrogenase fosfatases, nas mesmas situações que acarretam a estimulação alostérica da PDK 4, resultando, então, em um alto grau de fosforilação, e inativação, da piruvato desidrogenase.

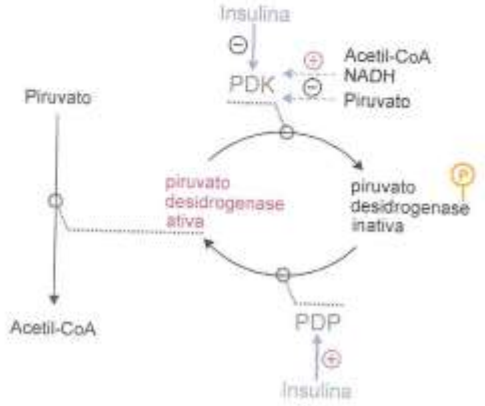


Fig. 20.9 Regulação do complexo piruvato desidrogenase. A inibição do complexo por fosforilação é catalisada pela piruvato desidrogenase quinase (PDK); a atividade é restabelecida por hidrólise do grupo fosfato, acionada pela piruvato desidrogenase fosfatase (PDP). Acetil-CoA e NADH são os efetuadores alostéricos positivos da PDK e piruvato, o efetuador negativo. A insulina promove a síntese de PDP e reduz a de PDK, levando à ativação da piruvato desidrogenase.

A inibição da piruvato desidrogenase no jejum e na atividade física seleciona o substrato a ser preferencialmente consumido, glicose ou ácidos graxos: favorece a utilização de ácidos graxos e é crucial para a economia de glicose. Os ácidos graxos são oxidados por músculos esqueléticos e cardíaco, fígado etc., poupando glicose para as células dela estritamente dependentes, como as do cérebro e as hemácias. A inativação da piruvato desidrogenase facilita a oxidação de ácidos graxos por "economizar" piruvato para a formação de oxaloacetato, cuja oferta ao ciclo de Krebs permite oxidar acetil-CoA.

Tendo em vista que não existem vias para converter acetil-CoA a glicose em mamíferos, o bloqueio da piruvato desidrogenase permite preservar, além da própria glicose, compostos gliconeogênicos quando o açúcar é insuficiente. No fígado, o piruvato disponível pode formar oxaloacetato, que ganha acesso à gliconeogênese, então estimulada, sintetizando glicose. A acetil-CoA originada da degradação de ácidos graxos não só causa a supressão da oxidação de piruvato, como *também estimula a carboxilação* de piruvato a oxaloacetato — a acetil-CoA é o efetuador comum às duas reações.

No jejum, as proteínas musculares são hidrolisadas e os aminoácidos são exportados como alanina: eles transaminam com piruvato e a alanina produzida é captada pelo fígado, onde é convertida a glicose e uréia. A inibição da piruvato desidrogenase pela PDK 4, além de propiciar níveis adequados de piruvato, garante a remoção do nitrogênio dos aminoácidos dos músculos na vigência de balanço de nitrogênio negativo durante o jejum prolongado. Nos períodos fisiológicos de jejum, decorrentes da alimentação intermitente, e no exercício intenso, uma conseqüência adicional da estimulação da PDK 4 em músculos seria direcionar o piruvato originado da glicólise para a formação de lactato, utilizado subseqüentemente para síntese de glicose no fígado, em vez de ser oxidado.

Por outro lado, quando há grande disponibilidade de glicose, a ativação do complexo piruvato desidrogenase permite a síntese de ATP e de ácidos graxos a partir do açúcar. Muita glicose significa muita insulina e muito piruvato, o efetuador alostérico negativo das piruvato desidrogenase quinases. A insulina, por intermédio da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), determinaria mudanças opostas na expressão das enzimas reguladoras, reprimindo a transcrição das quinases e induzindo a das fosfatases. O resultado é a desfosforilação do complexo e, portanto, a sua ativação. Novamente, a piruvato desidrogenase tem papel fundamental na "decisão" entre a oxidação de glicose ou de ácidos graxos. A estimulação da enzima quando a glicose é abundante acaba por limitar a oxidação de ácidos graxos, devido à produção de malonil-CoA, um intermediário da síntese de ácidos graxos, que impede a entrada de ácidos graxos na mitocôndria (Seção 20.7).

No estado diabético, a regulação da piruvato desidrogenase assemelha-se à do jejum, porque a repressão de PDK 4 e a indução de PDP 1 e 2 estão comprometidas, devido à falta de insulina ou resistência à sua atuação. A interrupção da oxidação de glicose e as outras ações das enzimas reguladoras contribuiriam para a hiperglicemia característica dessa doença. Uma outra hipótese, baseada nos níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos no diabetes, sugere que estes compostos, ou metabólitos deles derivados, ativariam uma cascata de reações que bloqueariam o receptor de insulina e, conseqüentemente, a via de sinalização da PI3K.

20.5 REGULAÇÃO DO CICLO DE KREBS

O ciclo de Krebs apenas reduz coenzimas, sem reoxidá-las. É, portanto, uma via que não tem autonomia funcional, necessitando do fornecimento de NAD^+ e FAD pela cadeia de transporte de elétrons para manter-se ativa. Deste modo, a velocidade de oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs está na dependência direta da velocidade da cadeia de

transporte de elétrons, que, por sua vez, funciona acoplada à síntese de ATP. As razões $NAD^+/NADH$ e ADP/ATP são especialmente importantes, não só porque o ciclo inclui três reações de óxido-redução que requerem NAD^+,como pelo fato de NADH, ADP e ATP serem efetuadores alostéricos de enzimas do ciclo.

A regulação do ciclo de Krebs incide sobre a produção de citrato e sobre sua oxidação a CO_2 e oxaloacetato.

A atividade da citrato sintase depende da concentração de oxaloacetato

O primeiro ponto de controle do ciclo é a reação catalisada pela *citrato sintase*. A atividade desta enzima depende, é claro, das concentrações de seus substratos, especialmente do nível de *oxaloacetato*, cujas baixas concentrações mitocondriais são o fator limitante da oxidação de acetil-CoA pelo ciclo. Esta limitação é contornada por maior formação de oxaloacetato induzida pela própria acetil-CoA: a *acetil-CoA* é efetuador alostérico positivo da *piruvato carboxilase*, que converte piruvato em oxaloacetato. Ao elevar-se o nível de acetil-CoA, como resultado da degradação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, a piruvato carboxilase ativada deriva o piruvato proveniente de carboidratos ou de aminoácidos para síntese de oxaloacetato. O acréscimo na oferta de oxaloacetato permite máxima atividade da citrato sintase.

O destino metabólico do citrato depende da atividade da isocitrato desidrogenase

Uma vez formado, o citrato poderá ser oxidado, por meio de prévia conversão a seu isômero, o isocitrato, por ação da aconitase. Se a oxidação de isocitrato estiver impedida, o equilíbrio da reação da aconitase favorece o acúmulo de citrato.

A "decisão" entre oxidação ou acúmulo de citrato está na dependência do segundo e mais importante sítio de regulação do ciclo de Krebs: a reação catalisada pela *isocitrato desidrogenase*. Sobre esta enzima atuam dois efetuadores alostéricos: o *ADP* tem efeito positivo, e o *NADH*, negativo. Níveis altos de ADP, assinalando a necessidade celular de ATP, estimulam a enzima, levando à oxidação de citrato. Este aumento da velocidade do ciclo leva à produção de coenzimas reduzidas e conseqüente ativação da fosforilação oxidativa. À medida que a concentração de ADP diminui, decresce também a velocidade da fosforilação oxidativa, havendo então elevação do teor de NADH, o inibidor alostérico da isocitrato desidrogenase. O citrato acumulado flui para o citossol, onde inibe a fosfofrutoquinase 1, ajustando a velocidade da glicólise à do ciclo de Krebs; além disto, é o citrato o precursor da formação de acetil-CoA citossólica que será utilizada na síntese de ácidos graxos. Desta forma, a inibição da isocitrato desidrogenase assinala suprimento adequado de ATP e desvia o fluxo metabólico da oxidação para o armazenamento.

O *complexo α-cetoglutarato desidrogenase* constitui o terceiro sítio de controle, sendo inibido por *succinil-CoA*, *NADH* e *ATP*. O ciclo apresenta ainda controles secundários: a *citrato sintase* é inibida competitivamente por *succinil-CoA*, e a *succinato desidrogenase*, por *oxaloacetato* (Fig. 20.10).

Não há regulações por modificação covalente descritas para o ciclo de Krebs. Nem mesmo a α-cetoglutarato desidrogenase, diferentemente da piruvato desidrogenase, tem sua atividade regulada por fosforilação/desfosforilação.

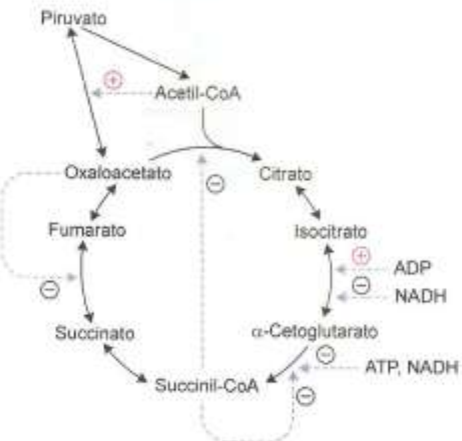


Fig. 20.10 Principais regulações alostéricas do ciclo de Krebs. As setas tracejadas azuis indicam regulações alostéricas, positivas (+) e negativas (−).

20.6 REGULAÇÃO DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

O transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondriais são processos fortemente acoplados. Realmente, se a síntese de ATP é absolutamente dependente do fluxo de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons ("cadeia respiratória"), a recíproca também é verdadeira, ou seja, a transferência de elétrons só ocorre enquanto houver síntese de ATP. O acoplamento é resultado do *controle respiratório*, exercido pela disponibilidade de ADP (Seção 11.4). O ADP é o fator limitante porque a maior produção de ATP acarreta, forçosamente, diminuição da concentração de ADP. A síntese de ATP processa-se, portanto, em velocidade paralela à sua utilização, sendo impedida sempre que o nível de ATP é compatível com a demanda. Vale lembrar que o conteúdo celular total de ATP é muito pequeno e sua utilização, ininterrupta e de intensidade muito variável. Um indivíduo adulto requer diariamente cerca de 2.000 vezes mais ATP do que seu organismo dispõe. Este dado enfatiza a obrigatoriedade da síntese contínua da ATP e evidencia o seu alto índice de renovação. Também explica o tempo diminuto em que uma célula aeróbia pode viver na ausência de oxigênio.

O controle respiratório tem um claro sentido de economia celular, como pode ser evidenciado pelas conseqüências de um eventual aumento da razão ATP/ADP. Por falta de ADP, a fosforilação oxidativa torna-se inoperante e a cadeia de transporte de elétrons também, devido ao acoplamento dos dois processos. Segue-se o acréscimo na concentração de NADH e $FADH_2$, que não podem mais ser oxidados pela cadeia de transporte de elétrons. As vias metabólicas degradativas que necessitam de NAD^+ e FAD, como o ciclo de Krebs, a oxidação de ácidos graxos etc., não podem prosseguir, ainda mais porque ATP e NADH passam a exercer seus efeitos de efetuadores alostéricos negativos em enzimas destas vias. Generalizando, a velocidade de produção de coenzimas reduzidas é função da velocidade de sua oxidação pela cadeia de transporte de elétrons, que depende da velocidade de síntese de ATP. O controle respiratório estabelece o ajuste perfeito da oxidação de substratos à necessidade celular de ATP, ou seja, a regulação do metabolismo energético.

Diversas evidências experimentais sugerem que a concentração de ADP não é o único fator determinante do controle respiratório em mitocôndrias de eucariotos. Postula-se a ocorrência de um *segundo mecanismo de controle respiratório*, assim denominado em contraposição ao primeiro mecanismo descrito, exercido pela disponibilidade de ADP. O segundo mecanismo do controle respiratório baseia-se na inibição alostérica da citocromo *c* oxidase (Complexo IV) por ATP. A inibição depende de intervenção hormonal: é abolida por ligação, à enzima, de hormônios tireoidianos, os principais reguladores da taxa metabólica basal em mamíferos e acionada por fosforilação da enzima pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA).

O primeiro mecanismo de controle respiratório opera em situações de valores elevados de potencial de membrana, quando as bombas de H^+ são inibidas e a ATP sintase é ativada (sua atividade aumenta com o potencial elétrico). A enzima, estimulada também por ADP, transloca prótons para dentro da mitocôndria, determinando a redução do gradiente eletroquímico e a ativação das bombas de H^+; o transporte de elétrons é, então, acelerado. O segundo mecanismo de controle respiratório atua quando o potencial de membrana é baixo e a razão ATP/ADP mitocondrial é alta. Sua função seria manter a força próton-motriz em valores relativamente baixos, o que é essencial para o desempenho adequado das atividades mitocondriais. É importante salientar que a membrana interna da mitocôndria é impermeável a H^+, apenas em condições de baixos potenciais de membrana; em valores altos, ocorre vazamento de prótons, resultando em desacoplamento da fosforilação oxidativa. Adicionalmente, a formação de radicais livres aumenta com o gradiente eletroquímico. A supressão do segundo mecanismo por hormônios tireoidianos eleva o potencial de membrana, provocando o desacoplamento parcial da fosforilação oxidativa e o aumento da taxa metabólica basal. A fosforilação, e a inibição, da citocromo *c* oxidase tem efeito oposto: otimiza a fosforilação oxidativa, por manter baixo o gradiente eletroquímico.

Até aqui foram descritos mecanismos de controle da *velocidade* da síntese de ATP e do transporte de elétrons. Deve-se analisar, ainda, a *eficiência* da fosforilação oxidativa e o grau de *termogênese* a ela subordinado. Esta regulação é particularmente importante em animais endotérmicos, que consomem uma parte considerável da energia produzida para a manutenção da temperatura corpórea. A eficiência da fosforilação oxidativa é definida pela razão P/O, entre fosfato (P_i) incorporado em ATP e oxigênio consumido. O desacoplamento da fosforilação oxidativa diminui a sua eficiência (reduz a razão P/O), levando à dissipação da força próton-motriz e ao aumento da termogênese. Os desacopladores artificiais, como o dinitrofenol, e as proteínas desacopladoras (UCPs) foram descritos na Seção 11.5. A atuação das UCPs termina por regular a fosforilação oxidativa, por impedir a elevação do potencial de membrana e a conseqüente inibição da citocromo *c* oxidase (e da cadeia de transporte de elétrons) pela grande quantidade de ATP sintetizado.

Uma outra causa de desacoplamento da fosforilação oxidativa, já mencionada, é o vazamento inespecífico de prótons através da membrana interna da mitocôndria, verificado quando o gradiente eletroquímico é alto. Finalmente, o

funcionamento inadequado dos componentes intrínsecos da fosforilação oxidativa também resulta em desacoplamento. Na presença de força próton-motriz elevada, as bombas de H^+ são menos eficazes, translocando menos prótons por elétron transferido, ou seja, diminui a estequiometria H^+/e^-, resultando em uma menor relação P/O. Este fenômeno está mais bem comprovado no Complexo IV; acarreta os mesmos resultados que os demais processos desacopladores: promove a termogênese e evita a produção de radicais livres.

Adicionalmente, qualquer transporte ativo, por exemplo, o transporte de metabólitos e íons através da membrana interna da mitocôndria, diminui a força próton-motriz e reduz a eficiência da fosforilação oxidativa.

O desacoplamento de mitocôndrias era considerado, originalmente, um artefato do método de isolamento das organelas. Na verdade, o gradiente eletroquímico não é totalmente utilizado para a síntese de ATP, e o desacoplamento deve ser considerado inerente à fosforilação oxidativa.

A regulação da fosforilação oxidativa, como se pode observar, está longe de ser compreendida de modo completo.

20.7 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE TRIACILGLICERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS

A utilização ou a recomposição do depósito de triacilgliceróis do tecido adiposo — a maior reserva energética dos mamíferos — ocorrem em condições de carência ou abundância de nutrientes, respectivamente, que desencadeiam processos reguladores diferentes. Variações das necessidades energéticas, que acontecem, por exemplo, entre o esforço físico vigoroso e o estado de repouso, também determinam alteração no sentido do metabolismo dos triacilgliceróis. Os hormônios que coordenam essas regulações são glucagon, epinefrina e insulina.

A degradação de triacilgliceróis é desencadeada por glucagon e epinefrina e inibida por insulina

A mobilização da reserva de triacilgliceróis depende, primariamente, da atividade da *lipase hormônio-sensível* dos adipócitos, que é regulada por modificação covalente.

Em condições de hipoglicemia, há liberação de glucagon e, na atividade física, de epinefrina. A interação destes hormônios com seus receptores (receptores β da epinefrina) nos adipócitos aciona a via de transdução de sinal da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) — a lipase é fosforilada, e ativada, pela PKA (Fig. 20.11). A lipase também é substrato da proteína quinase dependente de AMP (AMPK), que a converte igualmente na forma ativa; nas duas situações consideradas, o dispêndio de ATP eleva a concentração intracelular de AMP, o efetuador alostérico positivo da AMPK. Os triacilgliceróis são hidrolisados e os ácidos graxos liberados na corrente sangüínea, podendo suprir a demanda energética de tecidos como músculos e fígado. O aumento do nível de ácidos graxos no plasma promove a sua tomada por esses tecidos, aumentando a oferta de substratos para a β-oxidação. Esta via ocorre dentro da mitocôndria e é exatamente o transporte dos ácidos graxos para o interior dessa organela que determina a sua oxidação; no jejum, o transporte e a oxidação de ácidos graxos estão estimulados.

A insulina, liberada quando a glicemia é alta, sinalizando abundância de nutrientes, promove a desfosforilação e, portanto, a inibição da lipase dos adipócitos, por mecanismos ainda controversos, que incluem ativação da fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1) e diminuição dos níveis de cAMP. Por outro lado, derivados de purinas, como *cafeína e teofilina*, mantêm concentrações altas do nucleotídio cíclico, provocando aumento no teor plasmático de ácidos graxos em seres humanos.

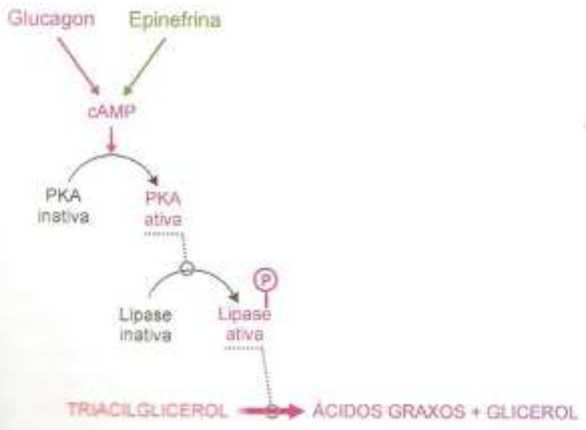


Fig. 20.11 Regulação da lipase hormônio-sensível do tecido adiposo. Glucagon e epinefrina provocam aumento da concentração de cAMP e a proteína quinase A (PKA) é estimulada. PKA catalisa a fosforilação da lípase que se torna ativa, promovendo a hidrólise dos triacilgliceróis.

A atividade da acetil-CoA carboxilase é crucial para a síntese de ácidos graxos

A síntese de ácidos graxos e, conseqüentemente, a de triacilgliceróis pelo fígado e adipócitos tem como ponto principal de regulação a formação de malonil-CoA a partir da acetil-CoA, catalisada pela *acetil-CoA carboxilase*. A enzima de aves e mamíferos é constituída por protômeros cataliticamente inativos que, ao se associarem, formam a enzima polimérica ativa. A conversão entre as formas ativa e inativa sofre regulação alostérica, que reflete o nível intracelular de efetuadores, e regulação hormonal, que sinaliza as necessidades globais do organismo.

A polimerização das subunidades processa-se na presença de *citrato*; o produto da via de síntese, *palmitoil-CoA*, tem efeito oposto, despolimerizando e inativando a enzima. Os níveis citoplasmáticos de citrato elevam-se quando não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs, em virtude da inibição da *isocitrato desidrogenase* e da *α-cetoglutarato desidrogenase*. É o que acontece quando a razão ATP/ADP celular é alta: o controle respiratório determina uma menor velocidade de oxidação de coenzimas pela cadeia de transporte de elétrons, havendo um acúmulo de NADH, o efetuador alostérico negativo das duas enzimas. O citrato então acumulado é transportado da mitocôndria para o citossol (Fig. 20.12), onde tem as atuações seguintes:

1. inibe a fosfofrutoquinase 1;
2. estimula a acetil-CoA carboxilase;
3. origina acetil-CoA citossólica.

O acúmulo de citrato sinaliza a disponibilidade de energia e de precursores para a síntese de ácidos graxos, obtidos, nos seres humanos, a partir de carboidratos da dieta, principalmente.

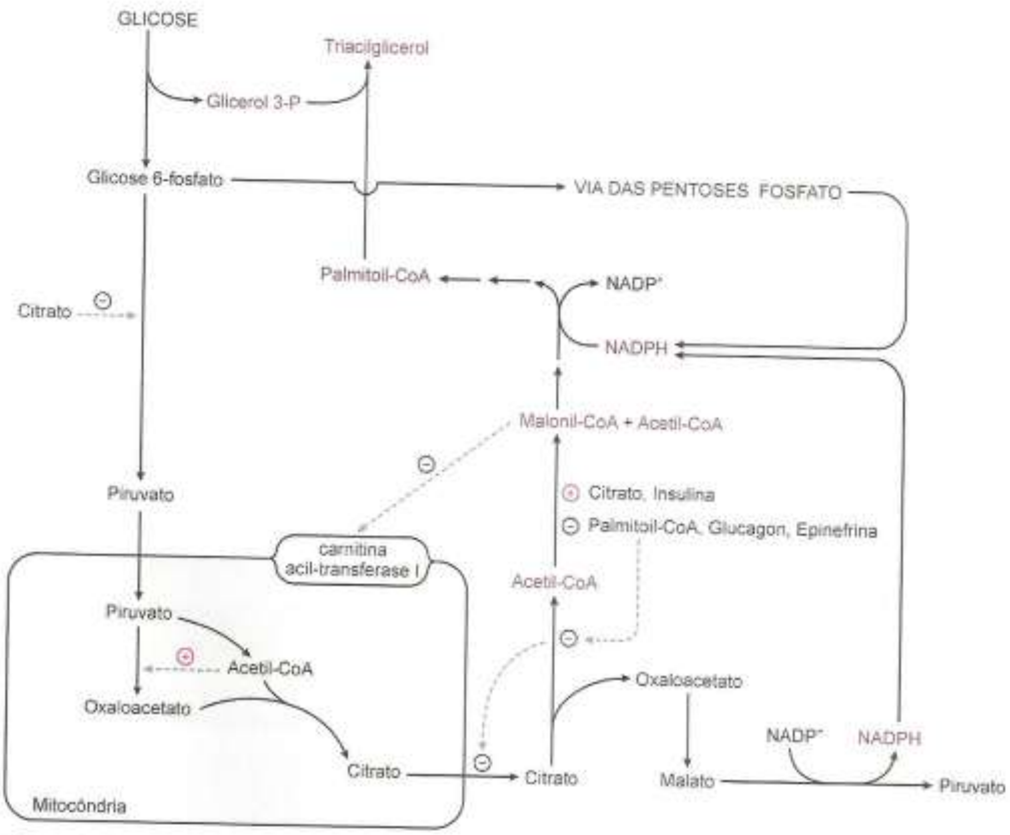


Fig. 20.12 Síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis a partir de glicose: visão geral das regulações alostéricas e hormonais. As setas tracejadas azuis indicam regulações alostéricas, positivas (+) e negativas (−). A acetil-CoA carboxilase, que catalisa a conversão de acetil-CoA a malonil-CoA, é fosforilada e inibida sob ação de glucagon e epinefrina, e desfosforilada e estimulada na presença de insulina.

Palmitoil-CoA, o efetuador alostérico negativo da acetil-CoA carboxilase, inibe, ainda, a *tricarboxilato translocase*, responsável pela transferência de citrato para o citossol, e a *citrato liase*, que recupera acetil-CoA a partir de citrato no citossol, exercendo um controle amplo sobre a síntese de ácidos graxos.

A acetil-CoA carboxilase é regulada por modificação covalente: sua fosforilação é acompanhada por dissociação nos protômeros inativos. Ela é fosforilada, e inibida, pela PKA e pela AMPK, as proteína quinases acionadas no jejum e no exercício. A insulina tem efeito oposto, determinando a desfosforilação e a estimulação da enzima. A regulação da citrato liase é homóloga à da glicogênio sintase: é fosforilada e inativada pela glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), que é bloqueada na presença de insulina. De todos estes modos, a insulina promove a síntese de ácidos graxos.

Nos vegetais e procariotos, a acetil-CoA carboxilase não exibe as regulações descritas para os mamíferos. A enzima de vegetais, localizada nos cloroplastos, é ativada por aumento do pH e da concentração de Mg^{2+} do estroma, obtidos sob incidência de luz. Nas bactérias, organismos que não armazenam triacilgliceróis, os ácidos graxos são utilizados fundamentalmente como precursores de lipídios estruturais de membrana; sua síntese, portanto, é estimulada quando ocorre divisão celular.

Durante a síntese de ácidos graxos, a sua degradação é impedida

A via da β-oxidação não é submetida a regulação alostérica ou modificação covalente. Na realidade, o seu funcionamento está subordinado ao suprimento de substrato, coenzima A, NAD^+ e FAD; o fornecimento das coenzimas oxidadas depende da cadeia de transporte de elétrons.

A disponibilidade de substrato para a β-oxidação é função da atividade do sistema de transporte de radicais acila para o interior da mitocôndria, o compartimento celular onde ocorre a sua degradação. Quando a acetil-CoA carboxilase está ativada — em situações de abundância de carboidratos e níveis altos de insulina — aumenta a concentração de malonil-CoA, que, além de ser substrato da síntese de ácidos graxos, exerce um papel regulador na degradação destes compostos. Malonil-CoA inibe a *carnitina acil transferase I* (Fig. 20.12), a enzima responsável pela introdução de radicais acila na mitocôndria. Esta inibição previne a entrada e a oxidação na mitocôndria dos ácidos graxos recém-sintetizados, pois, enquanto ocorre a síntese, os níveis citoplasmáticos de malonil-CoA permanecem elevados. No jejum, invertem-se os resultados das regulações.

Outras ações da insulina estimulam ainda mais a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis

A insulina, liberada no período absortivo, atua na síntese de lipídios desde a entrada de glicose nas células até a transcrição de genes que codificam enzimas da via.

O estímulo do transporte de glicose para as células aumenta não só a oferta de precursores para a síntese de ácidos graxos, como também a de glicerol 3-fosfato, permitindo a esterificação dos ácidos graxos sintetizados. O tecido adiposo, responsável pelo armazenamento de triacilgliceróis, não dispõe de glicerol quinase e obtém glicerol 3-fosfato por redução de diidroxiacetona fosfato, proveniente da glicose percorrendo a via glicolítica, igualmente estimulada por insulina. Só dispondo de glicose, o adipócito pode sintetizar e armazenar triacilgliceróis. Com efeito, os carboidratos da dieta são a principal fonte de carbonos para a formação do depósito de triacilgliceróis nos seres humanos. No fígado, o glicerol 3-fosfato pode ser formado por redução de diidroxiacetona fosfato ou por fosforilação de glicerol pela glicerol quinase, enzima restrita praticamente a este órgão.

Além da acetil-CoA carboxilase, outras enzimas são estimuladas por insulina, levando a um aumento na síntese de lipídios: *complexo piruvato desidrogenase* e *glicerol 3-fosfato acil transferase* (Seção 16.7).

A insulina induz a transcrição dos genes de diversas enzimas do metabolismo de triacilgliceróis, como a acetil-CoA carboxilase e a sintase de ácidos graxos. No jejum ou diabetes, estas ações são revertidas por glucagon.

No jejum, o glucagon determina a degradação de triacilgliceróis e ácidos graxos

A regulação da lipase dos adipócitos, descrita no início desta seção, determina a mobilização do depósito de triacilgliceróis em situações de jejum. Simultaneamente, no fígado, a síntese de ácidos graxos — já dificultada pela impossibilidade de produzir acetil-CoA a partir de glicose, devido à falta do açúcar e à inibição da glicólise e da piruvato desidrogenase — é bloqueada pela inativação da acetil-CoA carboxilase. Como conseqüência, há diminuição da concentração de malonil-CoA e ativação da carnitina acil transferase I, o que possibilita o transporte dos grupos acila dos ácidos graxos para a matriz mitocondrial, onde podem ser oxidados.

Assim, no jejum, o ciclo da β-oxidação funciona ativamente, alimentado pelos ácidos graxos liberados do tecido adiposo. Adicionalmente, como a glicólise e o ciclo de Krebs estão desativados, por falta de substrato e por todos os mecanismos inibitórios então desencadeados, as coenzimas oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons destinam-se exclusivamente ao ciclo de Lynen. A coenzima A utilizada por este ciclo provém da conversão de acetil-CoA a corpos cetônicos.

A acetil-CoA produzida na β-oxidação é desviada para a formação de corpos cetônicos, já que não pode ser quantitativamente oxidada pelo ciclo de Krebs, uma vez que o oxaloacetato está sendo seqüestrado pela gliconeogênese estimulada por glucagon. Deste modo, em condições de jejum, a obtenção de ATP pelo fígado depende da oxidação parcial de ácidos graxos pelo ciclo de Lynen. O glucagon, portanto, além de promover a manutenção da glicemia, provê o fornecimento de ácidos graxos e corpos cetônicos para satisfazer as necessidades energéticas dos tecidos que podem oxidá-los.

A síntese de ácidos graxos e de triacilgliceróis, como já assinalado, ficam inibidas no jejum, devido aos efeitos do glucagon, antagônicos aos da insulina, sobre a atividade e a concentração de enzimas.

No estado diabético, o bloqueio da produção de ácidos graxos e o aumento de sua degradação estabelecem níveis plasmáticos aumentados destes compostos, que poderiam induzir resistência à insulina.

O controle global do metabolismo de lipídios depende, efetivamente, da relação insulina/glucagon, assunto este que será detalhado no Capítulo 21.

20.8 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO COLESTEROL

As lipoproteínas plasmáticas encarregam-se da distribuição de colesterol aos tecidos e também da sua remoção

O colesterol presente na maioria das células do organismo humano é obtido por síntese *de novo*, a partir de acetil-CoA, ou é fornecido por lipoproteínas plasmáticas. O colesterol transportado pelas lipoproteínas origina-se da síntese endógena, sobretudo no fígado e intestino delgado, ou dos alimentos.

Os lipídios da dieta ganham a circulação sangüínea sob a forma de quilomícrons, sintetizados no intestino delgado (Fig. 20.13). Nos tecidos extra-hepáticos, os triacilgliceróis componentes dos quilomícrons são hidrolisados pela lipase lipoproteica, fornecendo ácidos graxos e glicerol. Os remanescentes dos quilomícrons, então enriquecidos em colesterol, são retirados da circulação pelo fígado. Os quilomícrons são, portanto, responsáveis pela distribuição de triacilgliceróis aos tecidos extra-hepáticos e de colesterol ao fígado.

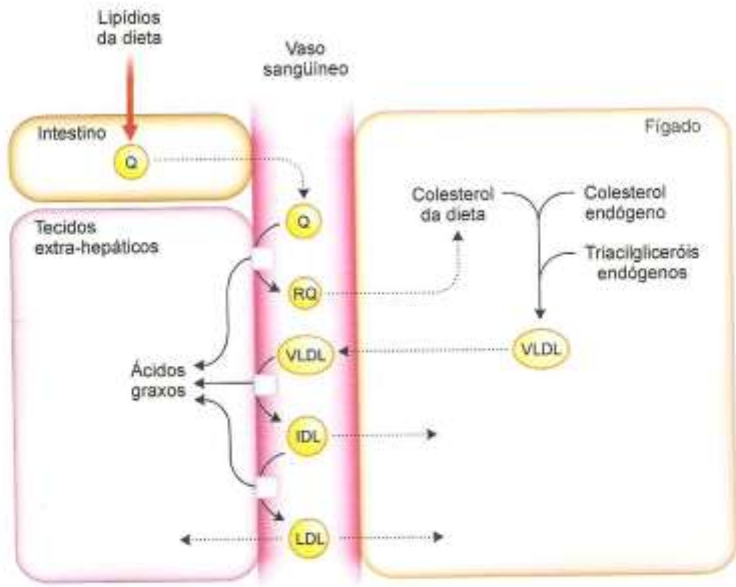


Fig. 20.13 Transporte de lipídios aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas. Os retângulos azuis voltados para o lúmen do vaso sangüíneo representam a lipase lipoproteica. Q: quilomícron; RQ: remanescente de quilomícron.



Fig. 20.14 Esquema simplificado da remoção de colesterol dos tecidos por HDL. As HDL são sintetizadas pelo fígado e intestino delgado como partículas discóides, as HDL nascentes. O excesso de colesterol dos tecidos é transferido, sob a forma de ésteres de colesterol, para as HDL nascentes, que se convertem em partículas esféricas, as HDL maduras. Estas podem transferir colesterol para outras lipoproteínas (VLDL e LDL) ou serem incorporadas pelo fígado, onde o colesterol excedente pode ser convertido em sais biliares e excretado. As outras partículas contendo alto teor de colesterol, VLDL e LDL, também são transferidas para o fígado, para excreção do colesterol.

Vale lembrar que, na situação pós-prandial, o fígado sintetiza ativamente triacilgliceróis e colesterol, que se somam àqueles provenientes dos quilomícrons. Os triacilgliceróis e o colesterol que excedem as necessidades dos próprios hepatócitos são utilizados para a síntese das *VLDL*[3], que são exportadas. À medida que estas lipoproteínas circulam pelos capilares que irrigam os tecidos extra-hepáticos, os triacilgliceróis delas componentes são hidrolisados pela lipase lipoproteica. Deste processo, resultam as *IDL*, enriquecidas em colesterol. Uma fração das IDL é captada pelo fígado e o restante, após outro ciclo de remoção de triacilgliceróis pelos tecidos periféricos, origina as *LDL*, as lipoproteínas plasmáticas que apresentam o maior teor de colesterol. As LDL constituem o principal veículo de colesterol no sangue: os tecidos, exceto fígado e intestino, obtêm a maior parte de seu colesterol exógeno a partir da endocitose de LDL.

As *HDL* atuam no sentido oposto ao das LDL, ou seja, removem colesterol dos tecidos extra-hepáticos (Fig. 20.14). São sintetizadas no fígado e, em menor extensão, no intestino delgado como uma lipoproteína rica em proteína e contendo um teor relativamente baixo de colesterol: são as chamadas *HDL nascentes*. Elas ligam-se à superfície dos tecidos e o excesso de colesterol intracelular é transferido para a membrana plasmática e, em seguida, para o interior das HDL, como ésteres de colesterol. As HDL enriquecidas em colesterol, as *HDL maduras*, podem ser diretamente absorvidas pelo fígado, onde o colesterol pode ser transformado em sais biliares, que são, então, excretados; adicionalmente, podem transferir o colesterol para outras lipoproteínas plasmáticas, VLDL e LDL principalmente, que também são absorvidas pelo fígado. Diz-se que as HDL efetuam o *transporte reverso de colesterol*, dos tecidos para o fígado, o único órgão capaz de eliminar colesterol.

A concentração de colesterol regula, indiretamente, a sua síntese

O teor de colesterol no plasma de um indivíduo sadio oscila dentro de um intervalo estreito. Esta homeostase é mantida, fundamentalmente, graças ao controle da transcrição de uma série de genes, por mecanismos acionados em condições de alto conteúdo de colesterol:

1. Repressão de genes que codificam enzimas da via de síntese de colesterol, a mais importante sendo a *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase* (*HMG-CoA redutase*). A enzima, a exemplo de outras enzimas que participam de vias biossintéticas, é inibida por fosforilação catalisada pela proteína quinase dependente de AMP (AMPK).

[3] A nomenclatura e a composição das lipoproteínas plasmáticas estão apresentadas na Tabela 6.2 (Seção 6.2.7).

2. Repressão do gene do *receptor de LDL*. As LDL penetram nas células por endocitose, iniciada pela ligação da lipoproteína a seu receptor presente na membrana plasmática. Sendo assim, uma diminuição do número de receptores de LDL propicia uma redução no aporte de colesterol para as células.
3. Indução de genes envolvidos no *transporte reverso de colesterol*, o transporte do excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado na forma de HDL, cujo nível aumenta.
4. Indução de genes relacionados com a *excreção de colesterol*, por exemplo, genes de enzimas reguladoras da via de síntese de sais biliares, propiciando a conversão de colesterol em sais biliares, ou seja, a sua excreção.

Assim, quando a concentração de colesterol se eleva, a síntese e a tomada pelas células são suprimidas e a remoção e a excreção deste composto, estimuladas. Durante muito tempo, não se sabia se estes efeitos eram devidos ao próprio colesterol ou a um seu metabólito. Os *oxiesteróides*, esteróides derivados do colesterol por incorporação de oxigênio na cadeia lateral, foram identificados como os compostos responsáveis pela modulação da expressão gênica; são intermediários de várias vias metabólicas, por exemplo, a síntese de sais biliares. Os sensores dos níveis elevados de oxiesteróides, que refletem o aumento da concentração de colesterol, são determinados receptores nucleares. A interação com os oxiesteróides leva à ativação destes receptores, que atuam como fatores de transcrição, ligando-se ao promotor dos genes-alvo; são capazes de regular a expressão gênica negativa ou positivamente.

A inibição da síntese de receptores de LDL, ocasionando uma menor incorporação celular de LDL-colesterol, tem como conseqüência o aumento da sua concentração no sangue (*colesterolemia*). A importância do número de receptores de LDL no controle do nível plasmático de colesterol é evidenciada por uma doença hereditária, a *hipercolesterolemia familiar*, caracterizada pela ausência de receptores funcionais e por concentrações muito elevadas de colesterol plasmático. As conseqüências do aumento do nível de colesterol e os procedimentos terapêuticos utilizados para obter sua redução serão descritos a seguir.

A aterosclerose correlaciona-se com níveis aumentados de colesterol plasmático

A regulação do metabolismo do colesterol passou a despertar interesse especial depois que foi estabelecida com clareza a relação entre níveis plasmáticos altos de colesterol e incidência de *aterosclerose*. Esta doença é devida a distúrbios no metabolismo de lipídios e à instalação de um processo inflamatório crônico na parede das artérias. Caracteriza-se pela deposição de lipídios — especialmente colesterol e ésteres de colesterol — na camada interna da parede de artérias, formando placas, denominadas *ateromas*[1]. A consistência inicial dos ateromas é pastosa, podendo evoluir para placas fibrosas e calcificadas. Estas lesões determinam um estreitamento de artérias e desencadeiam a formação de coágulos, que podem levar à sua oclusão. Resulta o bloqueio da irrigação do tecido em questão e a sua morte, devido à interrupção do aporte de oxigênio e de nutrientes e, conseqüentemente, da produção de energia. Isto é o que acontece nos casos de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar etc. A aterosclerose é o tipo mais freqüente de *arteriosclerose* (esclerose de artérias). A arteriosclerose predispõe à instalação de doenças cardiovasculares — coronariopatias (infarto do miocárdio), acidentes vasculares cerebrais (derrames), trombose de artérias periféricas etc. —, que constituem a principal causa de morte nos países desenvolvidos.

A ocorrência de aterosclerose não depende diretamente do teor total de colesterol plasmático, mas sim, da concentração da fração de LDL-colesterol. Por outro lado, há uma correlação negativa com o nível de HDL-colesterol, que tem um efeito protetor contra a aterosclerose, embora o mecanismo exato deste efeito não seja conhecido. Estas constatações são coerentes com as funções exercidas pelos dois tipos de lipoproteínas plasmáticas: as LDL *fornecem* colesterol aos tecidos e as HDL *removem* o excesso de colesterol das células, que, depois de transportado para o fígado, pode ser excretado. O LDL-colesterol e o HDL-colesterol costumam ser chamados de "mau" e "bom" colesterol, respectivamente. Esta denominação refere-se, é óbvio, ao papel desempenhado pelos dois tipos de lipoproteínas, já que a molécula de colesterol é sempre a mesma. Doenças caracterizadas por níveis elevados e crônicos de LDL, como o diabetes, costumam estar associadas à aterosclerose. Mas o exemplo mais dramático é a hipercolesterolemia familiar; os homozigotos apresentam concentração plasmática de LDL cerca de cinco vezes maior que o normal e a maioria morre de infarto do miocárdio na infância.

A predisposição genética tem influência decisiva na concentração do LDL-colesterol

Atualmente, acredita-se que o patrimônio genético de um indivíduo é o principal responsável pelo seu perfil de lipoproteínas plasmáticas e, portanto, pela possibilidade de desenvolver aterosclerose. Afora os portadores de defeitos

[1]A denominação *ateroma* deriva da palavra grega *athere*, que significa pastoso, seguida do sufixo *oma*, porque, quando as placas foram descobertas, acreditava-se serem formações tumorais.

genéticos relativamente raros, como a hipercolesterolemia familiar, uma parcela significativa da população dos países industrializados apresenta uma predisposição genética para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares. Todavia, diversos outros fatores, que poderiam ser chamados de "ambientais", interferem no nível de colesterol plasmático.

A quantidade e o tipo de lipídios da dieta têm influência fundamental sobre a concentração do colesterol sangüíneo e a sua distribuição nas lipoproteínas plasmáticas. A hipercolesterolemia pode ser desencadeada por ingestão excessiva de lipídios. A redução do teor de colesterol da dieta tem um efeito parcial, devido à estimulação concomitante da sua síntese endógena. As gorduras saturadas e as gorduras *trans* têm efeito hipercolesterolêmico e a sua substituição por gorduras contendo ácidos graxos mono ou poliinsaturados é extremamente benéfica na redução do colesterol do organismo. Os efeitos dos ácidos graxos sobre a colesterolemia e as suas fontes dietéticas encontram-se na Seção 18.2.2. As bases moleculares da atuação dos diferentes tipos de ácidos graxos ainda não são inteiramente compreendidas, mas é sabido que a intervenção dietética mais importante para estabelecer níveis recomendados de colesterol plasmático é reduzir o teor de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* da dieta.

Quando alterações na dieta não são suficientes para a normalização do colesterol plasmático, utilizam-se terapias medicamentosas, que visam (1) reduzir a síntese endógena de colesterol, (2) aumentar a sua excreção como sais biliares ou (3) diminuir a sua absorção. No primeiro caso, empregam-se inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, como as *estatinas*, que são metabólitos de fungos; no segundo caso, resinas positivamente carregadas (*colestiramina*, por exemplo), que, por ligarem-se aos sais biliares (negativamente carregados), impedem a sua reabsorção intestinal, intensificando a conversão de colesterol em sais biliares, ou seja, a sua excreção; no terceiro caso, inibidores da absorção de colesterol do lúmen do intestino delgado, como o *ezetimibe*. Tais terapias visam reduzir a concentração de colesterol, para estimular a síntese de receptores de LDL e, conseqüentemente, a maior tomada destas partículas pelo fígado, principalmente. Nos casos da utilização de drogas inibidoras da absorção de sais biliares ou de colesterol, os resultados obtidos são limitados, porque a diminuição do nível de colesterol estimula a sua síntese. Somente a adoção conjunta destas drogas com inibidores da síntese de colesterol propicia redução significativa da colesterolemia.

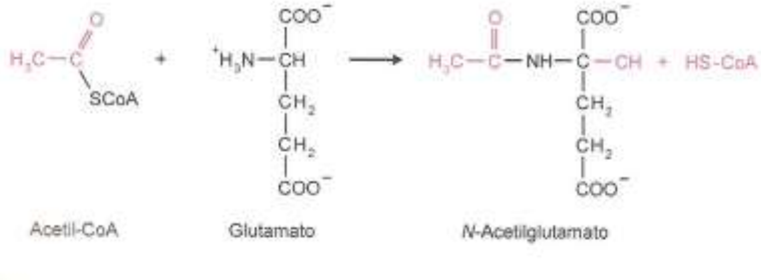
A qualidade de vida do indivíduo é, ainda, decisiva na prevenção da aterosclerose, que tem sido freqüentemente associada ao estresse emocional, sedentarismo, obesidade etc.

A aterosclerose é uma condição patológica extremamente complexa, afetada por um número muito grande de variáveis. A descoberta de novos tipos de lipoproteínas, cujo nível plasmático é determinado geneticamente, sem ser afetado por fatores ambientais, vem dificultar ainda mais a elaboração de esquemas terapêuticos para a sua prevenção.

20.9 REGULAÇÃO DO CICLO DA URÉIA

A quantidade de uréia excretada por um indivíduo hígido aumenta significativamente em duas situações pouco usuais: ingestão de dieta com alto teor de proteína e jejum prolongado. No primeiro caso, os aminoácidos excedentes originam os respectivos cetoácidos, que são convertidos em triacilgliceróis, e os grupos amino, que resultam em aumento da produção de uréia. No jejum prolongado, intensifica-se a proteólise muscular e as cadeias carbônicas dos aminoácidos são utilizadas como precursores da gliconeogênese; a eliminação dos grupos amino resultantes determina, igualmente, excreção aumentada de uréia. Nestas duas situações, há indução da síntese das enzimas do ciclo da uréia e da carbamoil-fosfato sintetase I, que podem ter suas concentrações elevadas de 10 a 20 vezes.

A síntese de uréia é submetida a regulação alostérica: a carbamoil-fosfato sintetase I é estimulada por *N-acetilglutamato*, um composto produzido a partir de acetil-CoA e glutamato:



A reação é catalisada pela N-*acetilglutamato sintase*, que é ativada por *arginina*. Se a produção de uréia não ocorrer em velocidade adequada para eliminar a amônia gerada no catabolismo de aminoácidos, acumulam-se intermediários do ciclo da uréia, dentre os quais, arginina. Graças à sua atuação como efetuador alostérico, este aminoácido provoca um aumento da concentração de *N*-acetilglutamato, que, por sua vez, estimula a carbamoil-fosfato sintetase I. Deste modo, a arginina permite adequar a velocidade de formação de amônia à sua conversão em uréia.

BIBLIOGRAFIA

Barthel A, Schmoll D: Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285** (4): E685-E692, 2003.

Bouché C et al: The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev* **25** (5): 807-830, 2004.

Choi, IY et al: Elucidation of the role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of glucose fluxes in mice using *in vivo* ^{13}C NMR measurements of hepatic carbohydrate metabolism. *Eur J Biochem* **269**: 4418-4426, 2002.

Collier JJ, Scott DK: Sweet changes: glucose homeostasis can be altered by manipulating genes controlling hepatic glucose metabolism. *Mol Endocrinol* **18** (5): 1051-1063, 2004.

Glass, CK: Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* **116**:556-560, 2006.

Jiang G, Zhang BB: Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** (4):E671-678, 2003.

Kadenbach B: Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1604** (2): 77-94, 2003.

Klip A, Hawkins M: Desperately seeking sugar: glial cells as hypoglycemia sensors. *J Clin Invest* **115**: 3403-3405, 2005.

Morris SM Jr: Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* **22**: 87-105, 2002.

Shepherd J: Lipids in health and disease. *Biochem Soc Trans* **32** (Pt 6):1051-1056, 2004.

Sugden MC, Holness MJ: Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** (5): E855-E862, 2003.

Van Schaftingen E, Gerin I: The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* **362**: 513-532, 2002.

Zelcer N, Tontonoz P: Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* **116** (3): 607-614, 2006.

21

Regulação Integrada do Metabolismo

As respostas do organismo humano a duas situações distintas — abundância e escassez de nutrientes — ilustram a integração dos processos que compõem a regulação metabólica. A adaptação às oscilações diárias da concentração de nutrientes é apenas um exemplo conhecido que evidencia as profundas alterações pelas quais os seres vivos ajustam seu metabolismo a diferentes condições. A forma principal de regular o metabolismo é modular a ação das enzimas, responsáveis pelas reações que se processam no organismo. Dentre os mecanismos que intervêm na ação enzimática, os mais relevantes são: mudança na atividade de enzimas, por regulação alostérica ou modificação covalente; variação da concentração de enzimas, por alteração da expressão gênica e intervenção hormonal. A integração metabólica ocorre, portanto, em dois níveis: o celular, que compreende os mecanismos reguladores intracelulares, e o nível do organismo como um todo, coordenado pela ação hormonal.

Várias seções deste livro, em especial nos Capítulos 19 e 20, referem-se a enzimas que sofrem mudança de atividade e/ou de concentração em função do excesso ou da carência de nutrientes. Este capítulo trata de reunir, dentre essas enzimas, as mais relevantes, examinando o funcionamento de vias metabólicas centrais em determinados órgãos/tecidos e como eles interagem para propiciar a adaptação do organismo por inteiro frente à disponibilidade de nutrientes.

A concentração e a atividade das enzimas variam com a oferta de nutrientes

Quando há ingestão de nutrientes, os próprios nutrientes e, mais importante, os hormônios que aumentam de concentração nessas condições — insulina, basicamente — induzem a síntese de enzimas de vias biossintéticas; uma exceção importante é a repressão das enzimas da gliconeogênese, a via que sintetiza glicose. Concomitantemente, esses hormônios reprimem a síntese de outras enzimas, como as que aceleram a mobilização dos depósitos de energia. Nos intervalos entre as refeições, a situação inverte-se: devido à queda do nível dos hormônios predominantes anteriormente e pela liberação de outros hormônios — glucagon, principalmente, e cortisol — a produção das enzimas das vias de síntese é reprimida e há estimulação da síntese de enzimas das vias degradativas e também da gliconeogênese, capacitando o fígado a fornecer glicose, indispensável a diversas células.

Em resumo, as flutuações na oferta de nutrientes ao longo do dia correspondem a flutuações dos níveis absolutos de insulina e glucagon e, ainda mais importante, da *razão insulina/glucagon*, tendo em vista que a concentração de insulina varia muito mais do que a de glucagon. Um dos resultados é a alternância de indução ou repressão da transcrição de genes estruturais de enzimas, que terão, então, suas concentrações modificadas. Particularmente notável é a repercussão da razão insulina/glucagon na concentração de enzimas hepáticas (Tabela 21.1).

Um outro resultado, mais imediato, são as oscilações na atividade de enzimas, por regulação alostérica ou modificação covalente, que também dependem do estado nutricional e, conseqüentemente, da razão insulina/glucagon. O grau de fosforilação das enzimas, a modificação covalente mais importante, é a resultante das ações opostas de pro-

Tabela 21.1 Enzimas hepáticas cujas concentrações são alteradas com a disponibilidade de nutrientes e com a razão insulina/glucagon

Período absortivo (insulina/glucagon alta)		Jejum (insulina/glucagon baixa)	
Enzimas induzidas	Enzimas reprimidas	Enzimas induzidas	Enzimas reprimidas
Glicoquinase	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Glicoquinase
Glicose 6-fosfato desidrogenase	Piruvato desidrogenase quinase	Piruvato desidrogenase quinase	
6-Fosfogliconato desidrogenase	Piruvato carboxilase	Piruvato carboxilase	
Fosfofrutoquinase 1	Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 1,6-bisfosfatase	Fosfofrutoquinase 1
Piruvato quinase	Glicose 6-fosfatase	Glicose 6-fosfatase	Piruvato quinase
Enzima málica		Transaminases	
Citrato liase		Glutaminase	
Acetil-CoA carboxilase		Enzimas do Ciclo da Uréia	
Sintase de ácidos graxos		Carnitina-acil transferase I	
Δ9 dessaturase		HMG-CoA sintase	

teína quinases e de proteína fosfatases, sendo as mais bem caracterizadas a proteína quinase A (PKA) e a fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1).

A integração metabólica será analisada nos períodos subseqüentes à ingestão de uma refeição: período absortivo (ou pós-prandial), pós-absortivo e jejum.

21.1 PERÍODO ABSORTIVO

No período absortivo prevalecem os efeitos da insulina

O *período absortivo* ou *pós-prandial*, que se segue à tomada de refeições, caracteriza-se, naturalmente, pela ocorrência de processos biossintéticos que incluem a recomposição das reservas energéticas (Tabela 21.2), diminuídas pelo jejum precedente.

Após uma refeição, os nutrientes absorvidos no intestino são conduzidos diretamente ao fígado. Este órgão retém uma fração considerável da glicose recebida e o seu conteúdo de glicogênio é elevado de 70 g (5% do seu peso) para 120 g, em média. O excedente de glicose é mantido em circulação, provocando aumento da

Tabela 21.2 Distribuição das reservas energéticas de um homem adulto

Órgão/tecido	Composto armazenado	Massa (kg)	Energia disponível (kcal)	(kJ)
Fígado	Glicogênio	0,120	480	2.008
Músculo	Glicogênio	0,300	1.200	5.020
Músculo	Proteína[1]	6	24.000	100.410
Adiposo	Triacilglicerol	15	135.000	564.840

[1]Embora proteína não constitua material de reserva, em jejum extremo 50% do seu total chegam a ser consumidos.

glicemia, a que o pâncreas responde aumentando a liberação de insulina e diminuindo a de glucagon (Fig. 21.1 e Tabela 21.3).

A *elevação da razão insulina/glucagon* determina profundas e amplas alterações metabólicas, decorrentes da supressão das vias de transdução de sinal do glucagon, destacando-se a via da proteína quinase dependente de cAMP ou proteína quinase A (PKA), e da ocorrência das vias de sinalização da insulina, como a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Estas vias de sinalização, descritas no Capítulo 19, interferem no grau de fosforilação de enzimas e, portanto, em sua atividade, e também na concentração de enzimas, por mudança na velocidade de sua síntese. Com a diminuição do nível de glucagon, a PKA fica inativa; com o aumento do nível de insulina, a proteína quinase (PKB) e a fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1) são estimuladas — o resultado é a predominância da forma desfosforilada das proteínas-substrato dessas enzimas. Segue-se a descrição das conseqüências destes eventos reguladores em algumas células-alvo desses hormônios, também resumidas na Fig. 21.2.

Nos hepatócitos, a PKA deixa de fosforilar as suas proteínas-substrato. Entre estas está o Inibidor-1 da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1) e a própria PP-1, que deixa de ser inibida; a fosforilação pela proteína quinase (PKB), ativada na via

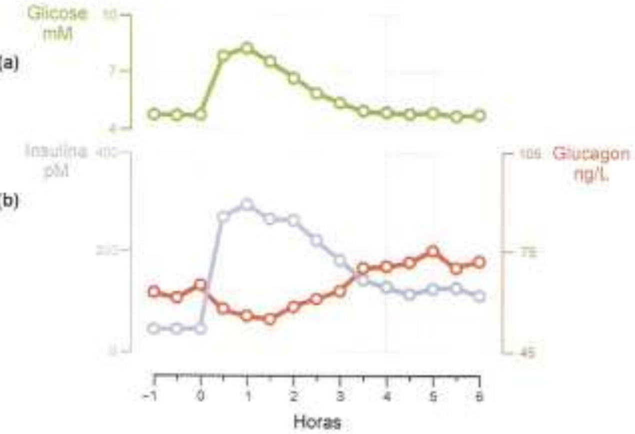


Fig. 21.1 Concentrações plasmáticas de glicose (a) e de hormônios (b) após a ingestão de uma refeição (tempo zero), subseqüente a 14 h de jejum. A partir da tomada da refeição, a glicose sangüínea passou de 4 mM para um máximo de 8 mM em 1 hora, retornando a níveis próximos dos basais em 4 h. A insulina seguiu um padrão semelhante. O glucagon diminuiu para um mínimo em 1,5 h e aumentou gradualmente até atingir valores um pouco maiores do que os basais no final do experimento. Baseada em Woerle HJ et al, 2003.

Tabela 21.3 Níveis plasmáticos de substratos (mM) e hormônios

	Período absortivo	Período pós-absortivo	Jejum		Diabetes tipo 1 não tratado
			3 dias	5 semanas	
Glicose	6,7	4,4	3,6	3,6	28
Ácidos graxos	0,3	0,6	1,5	1,4	2,5
β-hidroxibutirato	0,010	0,016	1,4	6	16
Acetoacetato	0,010	0,013	0,4	1,3	4
Alanina	0,8	0,34	0,32	0,14	0,30
Insulina (μU/mL)	100	15	7	6	< 5
Glucagon (pg/mL)	80	100	150	120	500
Insulina/glucagon	1,25	0,15	0,05	0,05	< 0,01
Bicarbonato	25	25	16		5

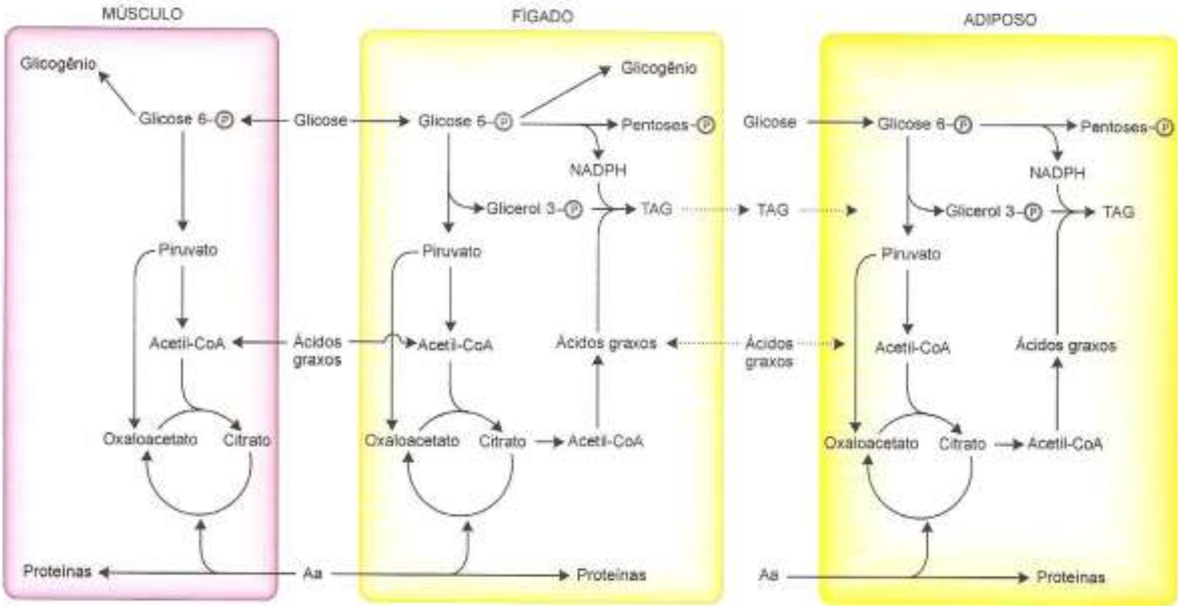


Fig. 21.2 Período absortivo: esquema da distribuição dos nutrientes absorvidos e de alguns de seus destinos metabólicos em músculos esqueléticos, fígado e tecido adiposo. O transporte de lipídios pelas lipoproteínas plasmáticas não está mostrado. A alta razão insulina/glucagon determina a predominância dos processos de síntese.

da PI3K, estimula PP-1 (Seção 19.4). PP-1, então, remove grupos fosfato da glicogênio fosforilase quinase, da glicogênio fosforilase *a* e da glicogênio sintase, inativando as duas primeiras e ativando a enzima de síntese. Uma outra enzima-alvo da PKB é a glicogênio sintase quinase (GSK3), que, na ausência de insulina, fosforila e inativa a glicogênio sintase. Com insulina, PKB fosforila e inativa GSK3, suspendendo o bloqueio antes exercido sobre a síntese de glicogênio. Deste modo, a degradação do glicogênio hepático é impedida e a síntese é estimulada.

A glicose proveniente da absorção é fosforilada no fígado pela glicoquinase, que está estimulada e cuja síntese é induzida por insulina. A glicose ativa a glicoquinase indiretamente, por promover o seu deslocamento do núcleo para o citoplasma, onde é capaz de catalisar a fosforilação da glicose. A glicose 6-fosfato, além de ser metabolizada pela glicólise, origina glicose 1-fosfato para a síntese de glicogênio. O grande aporte de glicose e a conseqüente formação de glicose 6-fosfato contribuem para a inibição da degradação do glicogênio, pois ambos os açúcares inibem a glicogênio fosforilase *a*. A síntese de glicogênio processa-se intensamente, uma vez que a glicogênio sintase está na forma desfosforilada, ativa. O fígado encaminha quase metade da glicose que recebe para a formação do polímero, cuja concentração final é, entretanto, limitada. Satisfeita a reserva de glicogênio, o remanescente é dirigido para a síntese de ácidos graxos.

No período pós-prandial, a gliconeogênese é inibida por insulina. Ela age, sobretudo, suprimindo a expressão dos genes de enzimas-chave da gliconeogênese, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase e a glicose 6-fosfatase, por ativação da via da PI3K. Adicionalmente, com a razão insulina/glucagon alta, a desfosforilação da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase faz prevalecer a atividade de quinase sobre a de fosfatase. Resultam níveis altos de frutose 2,6-bisfosfato, o efetuador alostérico negativo da frutose 1,6-bisfosfatase, concorrendo para a inoperância da gliconeogênese.

A via glicolítica funciona em grande velocidade, pois tem suas enzimas reguladoras, além da glicoquinase, na forma ativa. De fato, a fosfofrutoquinase 1 é ativada alostericamente por frutose 2,6-bisfosfato e o produto da reação por ela catalisada, a frutose 1,6-bisfosfato, estimula a piruvato quinase. Sob ação da insulina, a forma desfosforilada, ativa, da piruvato quinase é predominante. Esta situação prevalece enquanto houver consumo de frutose 6-fosfato pela glicólise. O acúmulo deste intermediário da via leva ao bloqueio da glicoquinase, por ficar retida no núcleo, formando um complexo inativo com a proteína reguladora.

O complexo piruvato desidrogenase encontra-se desfosforilado devido ao aumento do teor de piruvato, originário de glicose, que é o efetuador alostérico negativo das piruvato desidrogenase quinases, PDK 4 principalmente, e por causa da insulina. O hormônio induz a transcrição das piruvato desidrogenase fosfatases e reprime a das quinases. Por conseqüência, a forma assumida pelo complexo é a ativa.

O aumento de atividade das três enzimas-chave — fosfofrutoquinase 1, piruvato quinase e piruvato desidrogenase — determina grande produção de acetil-CoA a partir de glicose. A piruvato carboxilase é ativada pela acetil-CoA, desviando parte do piruvato para produção de oxaloacetato. Os esqueletos de carbono de vários aminoácidos vêm enriquecer a concentração de intermediários do ciclo de Krebs, capazes de se transformar em oxaloacetato. Esse substancial aumento dos dois substratos da citrato sintase — acetil-CoA e oxaloacetato — faz acelerar o ciclo de Krebs e, portanto, a produção de NADH e $FADH_2$. Dispondo de tantas coenzimas reduzidas, a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa ficam estimuladas, levando a grande produção de ATP. A alta atividade destes processos mantém-se enquanto a concentração de ADP permitir. À medida que a concentração de ADP diminui, a fosforilação oxidativa decresce e o controle respiratório determina também menor velocidade da cadeia de transporte de elétrons, com conseqüente elevação do nível de NADH.

A concentração intramitocondrial aumentada de NADH exerce efeito inibitório sobre o ciclo de Krebs, especialmente por efeito alostérico sobre a isocitrato desidrogenase e o complexo α-cetoglutarato desidrogenase. A conseqüência direta destas inibições é o *acúmulo de citrato*, que continua a ser produzido pela citrato sintase, mas não pode mais ser oxidado pelo ciclo de Krebs. O aumento da concentração mitocondrial de citrato promove seu transporte para o citossol, onde estimula a acetil-CoA carboxilase. Esta enzima e a citrato liase são ativadas por desfosforilação, além de serem induzidas, graças à influência da insulina. A acetil-CoA carboxilase transforma a acetil-CoA citossólica, produzida pela citrato liase a partir de citrato, em malonil-CoA. Malonil-CoA, além de ser substrato da síntese de ácidos graxos, inibe alostericamente a carnitina-acil transferase I, impedindo que os ácidos graxos recém-sintetizados sejam transportados para a mitocôndria e oxidados.

A síntese de ácidos graxos, por usar NADPH como poder redutor, faz cair a razão $NADPH/NADP^+$ citoplasmática, desbloqueando as desidrogenases da via das pentoses fosfato, que são competitivamente inibidas pela coenzima reduzida. A atividade da via é ainda mais favorecida pela indução da síntese de glicose 6-fosfato desidrogenase por insulina. A via das pentoses fosfato gera NADPH, também formado na conversão de malato citossólico a piruvato, catalisada pela enzima málica, cuja concentração está aumentada por insulina. A glicose 6-fosfato é direcionada para a via das pentoses fosfato, já que não pode ser metabolizada pela glicólise, que está bloqueada pelo controle alostérico vigente nessa situação. Realmente, as altas concentrações de ATP e de citrato inibem a fosfofrutoquinase 1; caem os níveis de frutose 1,6-bisfosfato, o efetuador alostérico positivo da piruvato quinase, que tem sua atividade prejudicada.

Estabelece-se, portanto, um equilíbrio dinâmico, em que a produção de NADPH, acetil-CoA extramitocondrial, malonil-CoA e ATP é contrabalançada pelo consumo destes compostos na síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis. Conforme a razão ATP/ADP diminui, em virtude da utilização de ATP nestas e em outras sínteses, a glicólise é reativada, a glicose 6-fosfato origina piruvato, que origina acetil-CoA e oxaloacetato, formam-se coenzimas reduzidas no ciclo de Krebs e, finalmente, ATP na fosforilação oxidativa. Isto acontece até que os níveis de ATP e citrato aumentem e voltem a inibir a glicólise: a glicose 6-fosfato passa a ser utilizada pela via das pentoses fosfato. Deve-se notar que o funcionamento alternado das duas vias permite manter o fluxo dos carbonos da glicose para formar ácidos graxos e produzir NADPH.

A insulina favorece a entrada de aminoácidos nos tecidos e a síntese de proteínas, de modo que apenas os aminoácidos excedentes estarão sendo oxidados e transformados em intermediários do ciclo de Krebs. A preferência dada à utilização de aminoácidos para a síntese proteica é resultado dos valores de K_M das duas categorias de enzima que têm os aminoácidos como substratos. As aminoacil-tRNA sintetases, que catalisam a ligação de aminoácidos aos tRNAs, encaminhando-os para a síntese de proteínas, têm valores de K_M muito menores do que as outras enzimas que metabolizam aminoácidos. Este fato é particularmente importante quando se consideram os aminoácidos essenciais.

Os produtos das sínteses hepáticas, com exceção do glicogênio, são destinados à exportação: os ácidos graxos, triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol e apoproteínas formam as lipoproteínas, que são liberadas na circulação.

No período absortivo todas as células podem receber glicose

Em condição de hiperglicemia, como a que ocorre no período absortivo, todos os transportadores de glicose estão atuantes, inclusive os que dependem de insulina para serem mobilizados para a membrana plasmática, como GLUT 4, que medeia a entrada de glicose no tecido adiposo e em músculos esqueléticos e cardíaco. Ou seja, todas as células tornam-se permeáveis à glicose.

Nos músculos esqueléticos, a glicose é polimerizada a glicogênio, e no tecido adiposo origina ácidos graxos e triacilgliceróis. Estas biossínteses sofrem regulação semelhante à das mesmas vias ocorrendo no fígado. Nos adipócitos, a glicose forma glicerol 3-fosfato, utilizado na esterificação dos ácidos graxos. Estes são também obtidos das lipoproteínas plasmáticas por ação da lipase lipoproteica, cuja concentração está aumentada por ação da insulina.

A lipase do tecido adiposo está bloqueada por desfosforilação promovida por insulina, de modo que os ácidos graxos produzidos no próprio adipócito, no fígado e os provenientes da dieta são depositados como triacilgliceróis.

Tendo em vista que os seres humanos, habitualmente, alimentam-se três vezes ao dia e que a absorção dos nutrientes ingeridos leva de 5 a 6 horas, o estado absortivo ou pós-prandial vigora durante a maior parte do dia. Está demonstrado que a hiperglicemia pós-prandial é um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos diabéticos. Assim sendo, a manutenção da homeostase de glicose no período absortivo tornou-se objeto de grande interesse, visando um maior entendimento da fisiopatologia do diabetes e a descoberta de alvos terapêuticos potenciais.

21.2 PERÍODO PÓS-ABSORTIVO

No período pós-absortivo prevalecem os efeitos do glucagon

A intensa remoção da glicose circulante pelos tecidos, permitida pela alta razão insulina/glucagon prevalente no período absortivo, reduz gradativamente a glicemia, até ser atingido o valor basal — em torno de 80 mg/100 mL, ou 4,4 mM — cerca de 4 horas após uma refeição. À medida que a glicemia aproxima-se desse valor, há uma inversão no hormônio secretado pelo pâncreas, passando a haver predomínio de glucagon. Inicia-se, assim, um outro período, chamado *pós-absortivo*, durante o qual a glicemia será mantida principalmente pela degradação do glicogênio hepático, com contribuição crescente da gliconeogênese. Este período tem duração média de 12 horas, incluindo, portanto, o jejum noturno.

Durante o período pós-absortivo, o decréscimo da concentração plasmática de glicose é acompanhado por uma *diminuição da razão insulina/glucagon* — a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), de transdução de sinal da insulina, é interrompida, e a via da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), de sinalização do glucagon, é iniciada. A razão insulina/glucagon, oposta à vigente no período absortivo, acarreta conseqüências, de certo modo, inversas. Nas células-alvo desses hormônios, a ativação da PKA e a desativação da proteína quinase B (PKB) e da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1) fazem predominar a forma fosforilada das proteínas-substrato. Muda também o resultado do controle da expressão gênica: enzimas reprimidas no período absortivo passam a ser induzidas. Até nova ingestão de alimentos, o sentido do metabolismo é invertido, passando a ser predominantemente degradativo.

O consumo de glicose passa a ser possível apenas pelos tecidos insulino-independentes, como cérebro, hemácias e medula renal, que oxidam apenas glicose. A captação de glicose pelos tecidos que dependem de insulina, como músculos e tecido adiposo, é drasticamente reduzida devido à queda na concentração de GLUT 4 na superfície celular. A economia de glicose é considerável, já que os dois tecidos em conjunto respondem por grande percentagem da massa corporal, e a glicose fica disponível para as células que a recebem por meio de transportadores insensíveis à insulina e que exibem baixos valores de K_M para o açúcar.

No fígado (Fig. 21.3), inicia-se a degradação de glicogênio, graças à fosforilação e ativação da glicogênio fosforilase, resultando na produção de glicose 6-fosfato. Entretanto, quantidades cada vez menores de glicose 6-fosfato são degradadas pela via glicolítica, em virtude da desativação de suas enzimas reguladoras. O glucagon estimula a PKA, que fosforila a 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, inibindo a primeira atividade e estimulando a segunda; caem, conseqüentemente, os níveis de frutose 2,6-bisfosfato, o principal ativador da fosfofrutoquinase 1. A piruvato quinase também é bloqueada por fosforilação catalisada pela PKA. Adicionalmente, o glucagon favorece a inibição da glicoquinase pela proteína reguladora e reprime a síntese de glicoquinase, fosfofrutoquinase 1 e piruvato quinase. O resultado é a interrupção da glicólise. A outra via de utilização da glicose 6-fosfato, a via das pentoses fosfato, também tem sua atividade reduzida, por inibição de suas desidrogenases por NADPH. Com efeito, a relação citossólica $NADPH/NADP^+$ eleva-se, pois a síntese de ácidos graxos está restringida pela escassez de substratos e por inativação da acetil-CoA carboxilase e da citrato liase. A primeira enzima é fosforilada pela PKA e a segunda pela glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), ativa na ausência de insulina. Assim sendo, dos destinos da glicose 6-fosfato derivada da degradação de glicogênio, somente sua conversão a glicose é possível. A glicose, liberada pelo hepatócito, mantém a glicemia. A reserva hepática de glicogênio, entretanto, é insuficiente para a manutenção da glicemia normal mesmo durante o jejum noturno, quando há uma produção crescente de glicose pela gliconeogênese.

Diversos mecanismos concorrem para ativar a gliconeogênese nos hepatócitos. A frutose 2,6-bisfosfato, que inibe a frutose 1,6-bisfosfatase, não está sendo produzida pela 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, que exibe apenas a atividade de fosfatase por estar fosforilada pela PKA. A acetil-CoA derivada da degradação de ácidos graxos (ver a seguir) atua como efetuador alostérico positivo da PDK 4 hepática e da piruvato carboxilase, inibindo a oxidação de piruvato pela piruvato desidrogenase no primeiro caso e, no segundo, estimulando a carboxilação de piruvato a

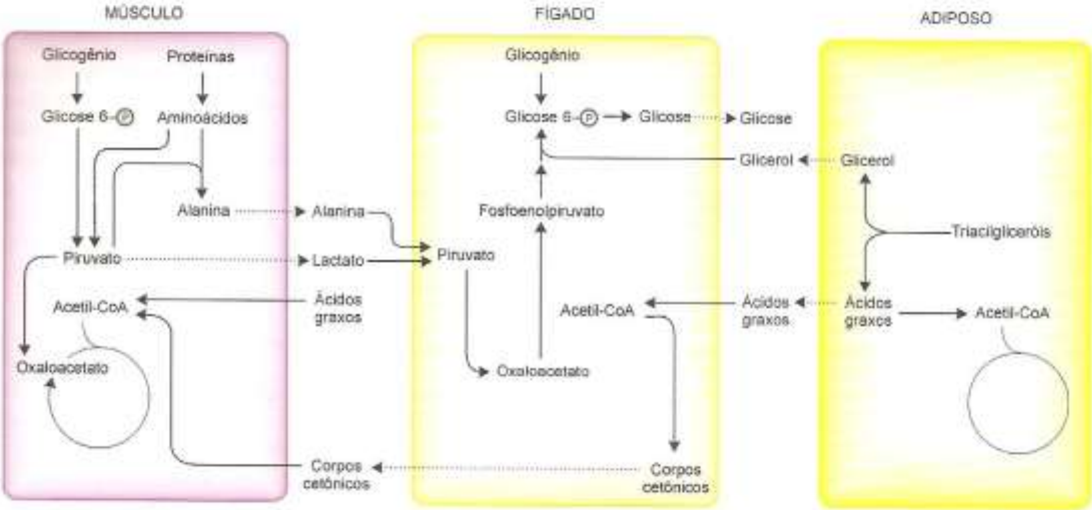


Fig. 21.3 Período pós-absortivo/jejum: esquema das principais adaptações metabólicas induzidas pela baixa razão insulina/glucagon. No fígado, notar a não-ocorrência do ciclo de Krebs devido ao consumo de oxaloacetato pela gliconeogênese, e o conseqüente desvio da acetil-CoA para formar corpos cetônicos; a inibição da piruvato desidrogenase impede que o piruvato seja oxidado a acetil-CoA e preservado para originar oxaloacetato. No músculo, esta enzima também está inativa e o piruvato não se transforma em acetil-CoA; pode ser convertido em oxaloacetato, que mantém o funcionamento do ciclo de Krebs, em alanina, por transaminação com aminoácidos, ou em lactato. Alanina, glutamina (não mostrada na figura) e lactato são exportados do músculo.

oxaloacetato, que origina glicose. À medida que aumenta a duração do jejum, a gliconeogênese torna-se mais intensa, devido ao aumento da concentração das enzimas: piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose 6-fosfatase, induzido por glucagon e cortisol. A gliconeogênese renal está igualmente estimulada.

A estimulação da lípase do tecido adiposo pela PKA e pela proteína quinase dependente de AMP (AMPK) promove a degradação dos triacilgliceróis armazenados, elevando o nível de ácidos graxos circulantes. Os ácidos graxos são essenciais para a manutenção das funções vitais de tecidos capazes de oxidá-los, como músculos esqueléticos e cardíaco, fígado, tecido adiposo etc. Nesta fase, a atividade hepática está canalizada para exportação de glicose, inicialmente proveniente do glicogênio e, a seguir, da gliconeogênese. Não há oxidação de glicose ou de aminoácidos no fígado que possa prover ATP para sustentar a gliconeogênese e outros processos hepáticos — o combustível utilizado são os ácidos graxos. É esta também a fonte de energia do tecido muscular.

As altas razões acetil-CoA/CoA e $NADH/NAD^+$ mitocondriais resultantes da oxidação de ácidos graxos estimulam alostericamente a piruvato desidrogenase quinase (PDK 4), que também é induzida nesta situação; ela fosforila e inibe o complexo piruvato desidrogenase. Nas células musculares, o bloqueio do complexo, ao impedir a oxidação aeróbia da glicose obtida da degradação de glicogênio, termina por favorecer a oxidação de ácidos graxos: o piruvato, impossibilitado de formar acetil-CoA, pode originar oxaloacetato para sustentar a oxidação da acetil-CoA derivada de ácidos graxos pelo ciclo de Krebs. No fígado, a piruvato desidrogenase está igualmente inativada, mas o oxaloacetato tem um outro destino, que é a síntese de glicose.

21.3 JEJUM

No jejum, intensificam-se os processos degradativos

O organismo humano tem uma capacidade notável de sobreviver sem ingerir alimentos por longos períodos de tempo, da ordem de 2 meses no caso de indivíduos saudáveis e até um ano, para obesos. Os estudos de Cahill, Owen e colaboradores, nas décadas de 1960 e 1970, foram decisivos para um maior entendimento das adaptações metabólicas ao jejum prolongado, em especial as que ocorrem no cérebro. Até então, acreditava-se ser a glicose o único substrato utilizado pelo cérebro, e os corpos cetônicos eram associados somente com a ocorrência de doenças, como o diabetes. Aqueles autores demonstraram, pela primeira vez, o papel essencial do consumo de corpos cetônicos pelo cérebro na

sobrevivência ao jejum prolongado. Adicionalmente, evidenciaram a correlação existente entre a excreção de nitrogênio e a síntese de glicose, além da importância da atuação dos rins durante o jejum. Os resultados obtidos contribuíram para entender as necessidades nutricionais dos seres humanos, o planejamento de dietas adequadas para a redução do peso corpóreo e as síndromes de desnutrição crônica, como *kwashiorkor* e marasmo (Seção 18.3), que afetam uma parcela significativa das crianças de países em desenvolvimento.

No jejum, o glucagon atua praticamente sem o antagonismo da insulina e coadjuvado pelo cortisol, adaptando o organismo a sobreviver sem a ingestão de nutrientes.

Além de 12 horas de jejum, quando a gliconeogênese é responsável por 50% da glicose circulante, sua importância como via produtora de glicose suplanta a da glicogenólise. O glicogênio hepático está praticamente esgotado com 24 horas de jejum, e após este tempo a gliconeogênese será a única via capaz de manter a glicemia.

O principal substrato da síntese de glicose são os aminoácidos provenientes da degradação das proteínas dos músculos esqueléticos (Fig. 21.3). Essas proteínas, como todas, sofrem renovação contínua, mas, no jejum, sua síntese está prejudicada, pois há níveis baixos de insulina e sua degradação está estimulada por cortisol. O resultado líquido da descompensação entre síntese e degradação é o aumento da concentração de aminoácidos livres nas fibras musculares. A maioria dos aminoácidos é parcialmente metabolizada, originando intermediários passíveis de serem convertidos a alanina e glutamina. Nessas células, a transaminase específica para os aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina e valina) é particularmente ativa. A atuação desta enzima, e das demais transaminases, resulta na transferência do grupo amino dos aminoácidos ramificados e de outros aminoácidos para piruvato e α-cetoglutarato, formando alanina e glutamina; piruvato e α-cetoglutarato são provenientes da degradação de glicogênio e de diversos aminoácidos do músculo. O bloqueio do complexo piruvato desidrogenase, fosforilada pela isoenzima muscular da piruvato desidrogenase quinase (PDK 4), impede a oxidação de piruvato a acetil-CoA, preservando este composto para a formação de alanina. A alanina e a glutamina produzidas são liberadas na circulação, constituindo a forma de transporte do nitrogênio dos aminoácidos derivados da proteólise muscular. A alanina é captada principalmente pelo fígado, onde o seu α-cetoácido, o piruvato, forma glicose e o grupo amino forma uréia. A glutamina é utilizada como substrato pela gliconeogênese renal; enquanto o seu esqueleto de carbono origina glicose, o nitrogênio é convertido em íons NH_4^+, cuja excreção na urina contribui para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Assim, a gliconeogênese hepática e a renal estão associadas com a produção de uréia e de amônia, respectivamente. Como a eliminação do nitrogênio derivado dos aminoácidos utilizados para a síntese de glicose não é acompanhada de ingestão, estabelece-se um *balanço nitrogenado negativo*.

A intensa degradação de ácidos graxos, mobilizados das reservas lipídicas, não acompanhada de degradação proporcional de carboidratos, leva ao acúmulo de acetil-CoA no fígado: a deficiência de oxaloacetato, continuamente retirado pela gliconeogênese, restringe a oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs. A acetil-CoA acumulada condensa-se, formando os *corpos cetônicos* (Fig. 21.3). Nesta situação, o fígado obtém energia da oxidação de ácidos graxos a acetil-CoA; os tecidos muscular e adiposo, não engajados na gliconeogênese, dispõem de oxaloacetato suficiente para oxidar a acetil-CoA proveniente de ácidos graxos e corpos cetônicos a CO_2 e H_2O. O consumo de ácidos graxos e corpos cetônicos por estes tecidos coopera para a economia de glicose, que passa a ser utilizada praticamente apenas pelo cérebro e hemácias.

Se o jejum prolongar-se por algumas semanas, estes processos são, naturalmente, intensificados. Instala-se uma situação permanente de relação insulina/glucagon muito baixa que determina um metabolismo fortemente degradativo.

A maior parte da reserva energética orgânica está sob a forma de triacilgliceróis (Tabela 21.2). Os ácidos graxos não originam glicose, e o glicerol presente nesta reserva, embora seja gliconeogênico, contribui com uma parcela pouco significativa para o total de glicose necessário à manutenção da glicemia. A grande fonte potencial de glicose são os aminoácidos. Um indivíduo adulto tem na sua massa muscular cerca de 6 kg de proteína e não pode perder mais de 50% deste total sem risco de vida. Como cerca de 200 g de proteína devem ser degradados para produzir os 120 g diários de glicose consumidos pelo cérebro, o conteúdo proteico proveria glicose por duas semanas apenas. No entanto, indivíduos saudáveis chegam a sobreviver a 1-2 meses de jejum. Uma adaptação decisiva para permitir esta longa sobrevida é o desenvolvimento, pelo cérebro, da capacidade de oxidar corpos cetônicos, além de glicose. A utilização desta nova fonte permite grande economia de glicose: após 2-3 dias de jejum, diminui a intensidade da gliconeogênese e, conseqüentemente, a espoliação proteica, refletida na queda da excreção de nitrogênio urinário. Depois de 5 semanas de jejum, verifica-se a produção de apenas 5 g de glicose a mais do que a derivada da renovação de proteínas endógenas. Nesta fase, os corpos cetônicos perfazem cerca de 60% do suprimento energético do cérebro.

A enorme produção de corpos cetônicos pelo fígado ultrapassa muito sua captação pelos tecidos extra-hepáticos. Como estes compostos têm caráter ácido, o poder tamponante do plasma é sobrepujado e instala-se uma acidose, a *cetoacidose*, com significativa redução do nível de bicarbonato plasmático (Tabela 21.3).

A Fig. 21.4 mostra os resultados do trabalho de Cahill e colaboradores sobre os processos utilizados para manter a homeostase de glicose no jejum prolongado. A homeostase da glicose foi dividida em cinco fases, segundo a procedência predominante da glicose plasmática a partir da ingestão de uma refeição — ver também a Tabela 21.4. Na Fase I, a glicose é provida pelos carboidratos dos alimentos. Uma vez esgotado este suprimento, inicia-se a Fase II, durante a qual a glicemia é mantida pela glicogenólise hepática. À medida que diminui a reserva de glicogênio do fígado, a gliconeogênese torna-se cada vez mais importante, até que, após 16 h (12 h, segundo estudos mais recentes), contribui com 50% da glicose plasmática. Inicia-se a Fase III, na qual esta via é a fonte principal de glicose. Estas mudanças ocorrem dentro de mais ou menos 24 horas de jejum. Vários dias de jejum levam à Fase IV, na qual se inicia uma menor dependência da gliconeogênese: notar, na Fig. 21.4, a queda no consumo de glicose que ocorre com 2-3 dias de jejum. Isto acontece porque os corpos cetônicos acumularam-se em níveis suficientemente altos para induzir sua entrada e sua oxidação no cérebro, onde passam a substituir parte da glicose anteriormente consumida para obter energia. A Fase V ocorre depois de algumas semanas de jejum e caracteriza-se por dependência ainda menor da gliconeogênese.

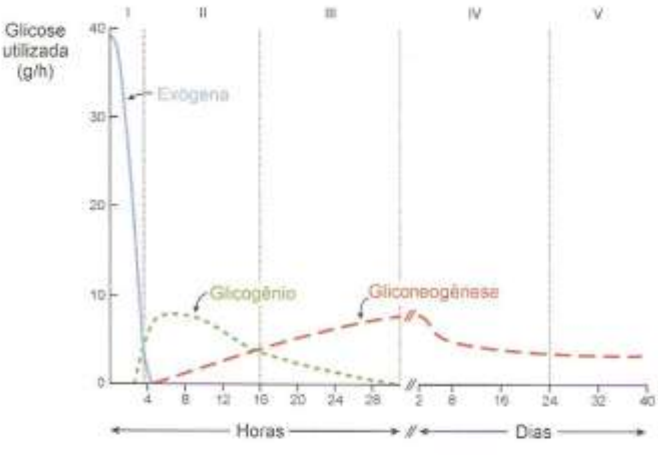


Fig. 21.4 As cinco fases da homeostase da glicose em seres humanos. A figura mostra a quantidade de glicose utilizada e as suas origens — exógena ou da dieta, glicogênio hepático e gliconeogênese hepática e renal — ao longo do tempo, após a ingestão de uma refeição (tempo zero). Ver também a Tabela 21.4. Reproduzida de Ruderman NB, Aoki TT and Cahill GF Jr *in* Hanson RW, Mehlman MA (editors): *Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species*, p. 515. John Wiley & Sons, 1976.

Tabela 21.4 As cinco fases da homeostase de glicose: origem da glicose sangüínea, tecidos e órgãos que a utilizam e principais combustíveis para o cérebro nas diferentes fases[1]

	Fases				
	I	II	III	IV	V
Origem da glicose sangüínea	Exógena	Glicogênio hepático; gliconeogênese hepática.	Gliconeogênese hepática; glicogênio hepático.	Gliconeogênese hepática e renal.	Gliconeogênese hepática e renal.
Tecidos/órgãos que usam glicose	Todos	Todos, exceto o fígado; músculo e adiposo em velocidades baixas.	Todos, exceto o fígado; músculo e adiposo em velocidades intermediárias entre as Fases II e IV.	Cérebro, hemácias, medula renal; pequenas quantidades pelo músculo.	Cérebro, em velocidades baixas, hemácias, medula renal.
Principal combustível do cérebro	Glicose	Glicose	Glicose	Glicose, corpos cetônicos.	Corpos cetônicos, glicose.

[1]Reproduzido de Ruderman NB et al, 1976.

As necessidades energéticas da maioria dos tecidos nesta fase são satisfeitas, em grande parte, por oxidação de ácidos graxos ou de corpos cetônicos. Enquanto as concentrações de corpos cetônicos forem elevadas, a proteólise será menos intensa, preservando as proteínas musculares. Esta situação permanece até praticamente toda a gordura ser consumida. Depois disto, as proteínas musculares têm de ser utilizadas e, antes que se esgotem, advém a morte.

21.4 DIABETES

A produção deficiente de insulina ou a resistência à sua ação ocasiona o diabetes

O *diabetes mellitus* é uma doença metabólica complexa que se apresenta sob formas diferentes, que têm em comum a hiperglicemia. Pode ser provocada por graus variáveis de deficiência de insulina e de redução da sensibilidade das células-alvo ao hormônio. Há dois tipos principais de diabetes.

O *diabetes tipo 1* (*insulino-dependente* ou *juvenil*) caracteriza-se por incapacidade de produzir insulina, resultado da destruição de células β das ilhotas do pâncreas, geralmente causada por um distúrbio auto-imune. Manifesta-se mais freqüentemente em crianças e adolescentes.

O *diabetes tipo 2* (*insulino-independente* ou *da maturidade*), a forma mais comum do diabetes, caracteriza-se por resistência à insulina e por secreção deficiente de insulina, sendo que um distúrbio pode predominar sobre o outro. A resistência à insulina é uma condição na qual os tecidos deixam de responder à insulina, havendo a supressão dos seus efeitos mais marcantes, que são o estímulo da entrada de glicose nos tecidos, principalmente músculos e adiposo, e a inibição da produção de glicose pelo fígado. A hiperglicemia resultante estimula o pâncreas a secretar mais insulina, no sentido de normalizar a concentração de glicose sangüínea; todavia, mesmo na presença de altas concentrações do hormônio circulante, a glicemia permanece elevada. Em muitos casos, a estimulação crônica das células β do pâncreas leva à sua falência e à secreção deficiente do hormônio. A etiologia da resistência à insulina não está totalmente elucidada.

O diabetes tipo 2 ocorre associado a uma síndrome metabólica multifacetada — *Síndrome Metabólica* ou *Síndrome X* — que, além da resistência à insulina, inclui obesidade, dislipemia (níveis plasmáticos aumentados de triacilgliceróis e LDL-colesterol e níveis reduzidos de HDL-colesterol) e hipertensão arterial. A obesidade freqüentemente precede o desenvolvimento do diabetes tipo 2 e parece ser o principal fator desencadeante da moléstia: 80% dos diabéticos estão acima do peso adequado. Historicamente, era considerada uma doença característica de pessoas mais velhas, mas, com o aumento da incidência de obesidade em crianças, adolescentes e adultos jovens, passou a incidir também nestas populações.

O diabetes tipo 2 pode evoluir para as mesmas complicações clínicas que o diabetes tipo 1, tais como: doenças cardiovasculares — a principal causa de morte entre os diabéticos —, neuropatias, nefropatias, retinopatias, catarata etc.

No diabetes, o organismo comporta-se como no jejum

Um quadro metabólico muito semelhante ao descrito para o jejum prolongado é encontrado nos casos de diabetes tipo 1 (insulino-dependente) não tratado. A deficiência na produção de insulina impede o aproveitamento de glicose pelos tecidos insulino-dependentes e aumenta a produção de glicose pelo fígado, levando à hiperglicemia. Como deixa de haver inibição da síntese de glucagon por insulina, resulta uma hiperglucagonemia, agravando a hiperglicemia. Fica imposta ao organismo uma razão insulina/glucagon permanentemente baixa, mimetizando uma situação de carência nutricional, apesar dos altos níveis plasmáticos de glicose (Tabela 21.4). Desta forma, prevalece o metabolismo degradativo: gliconeogênese acentuada, levando a intensa proteólise; lipólise acelerada, com alta produção de corpos cetônicos, que pode ocasionar cetoacidose grave, e balanço nitrogenado negativo. Todas estas alterações metabólicas são derivadas da carência celular de glicose e aminoácidos. Entretanto, a hiperglicemia também tem conseqüências. Os níveis glicêmicos altos mantêm as células em hiperosmolaridade e acarretam uma sobrecarga renal. A eliminação urinária elevada de glicose é acompanhada da perda de grandes volumes líquidos, levando à depleção de eletrólitos.

Muitas das complicações do diabetes parecem estar associadas à glicosilação de proteínas, provocada pela alta concentração de glicose circulante. Proteínas impropriamente glicosiladas têm suas funções prejudicadas. O monitoramento a longo prazo do grau e da duração da hiperglicemia pode ser feito medindo a intensidade da glicosilação, e a proteína alvo utilizada para este exame é a hemoglobina. O teor de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) reflete o valor médio da concentração de glicose ao longo dos três meses precedentes: indivíduos diabéticos podem apresentar concentrações de HbA_{1c} até três vezes maiores que indivíduos normais. Medidas da concentração de hemoglobina glicosilada constituem o procedimento padrão para avaliar a eficácia da abordagem terapêutica adotada para o tratamento da doença, adicionalmente a medidas pontuais da glicemia.

O controle estrito da glicemia é recomendado para todos os pacientes com diabetes, tendo em vista que a hiperglicemia, em particular a hiperglicemia pós-prandial, está fortemente associada à incidência de doenças cardiovasculares.

No início da década de 1920, acreditava-se que o quadro descrito para o diabetes tipo 1 poderia ser revertido com a administração do hormônio deficitário. Todavia, passadas algumas décadas, verificou-se que injeções periódicas de insulina não eram capazes de reproduzir o controle extremamente sofisticado do metabolismo, resultando em uma expectativa de vida reduzida, devido à instalação dos processos degenerativos inerentes à doença. Inúmeras estratégias terapêuticas foram desenvolvidas desde então, na tentativa de mimetizar os padrões fisiológicos de secreção de insulina, tornando possível o controle eficiente da glicemia.

As insulinas bovina e suína foram substituídas por insulina humana recombinante e, a partir de meados da década de 1990, tornaram-se disponíveis os *análogos de insulina*, resultantes de alterações na seqüência de aminoácidos da cadeia β da insulina humana. Por exemplo, na *Insulina Aspart*, o resíduo de prolina na posição 28 (Pro 28) é substituído por aspartato e na *Insulina Lispro*, a Pro 28 é trocada de posição com a lisina 29. Os análogos de insulina podem ser de ação rápida, intermediária ou lenta, permitindo ajustar os níveis de glicose na situação pós-prandial e nos períodos de jejum. Adicionalmente, estão disponíveis novos sistemas de infusão contínua de insulina ("bomba de insulina") que respondem com maior precisão a variações da glicemia do que injeções de insulina. Uma nova forma de administração de insulina, não-invasiva e, portanto, mais bem aceita pelos pacientes, está disponível a partir de 2006: é a insulina em pó, absorvida por inalação (*insulina inalável*), empregada como alternativa para as insulinas subcutâneas de ação rápida. Porém, os efeitos a longo prazo sobre a função pulmonar não são conhecidos.

Os pacientes com diabetes tipo 1 necessitam de terapia insulínica permanente, a não ser que recebam transplante de pâncreas inteiro ou de ilhotas de Langerhans, uma abordagem terapêutica utilizada ainda em escala reduzida.

O controle do diabetes tipo 2 é conseguido por uma combinação de abordagens terapêuticas: regime alimentar, atividade física, administração de antidiabéticos orais e, ainda, insulina. Com efeito, devido aos benefícios advindos do controle rígido da glicemia, o uso de insulina, ou de análogos de insulina, passou a ser mais comum e precocemente empregado. Os antidiabéticos (ou hipoglicemiantes) orais são agentes farmacológicos que determinam redução da glicemia por atuações diversas, tais como: reduzir a produção de glicose pelo fígado, promover a tomada do açúcar pelas células, estimular a secreção de insulina do pâncreas, retardar a digestão e, portanto, a absorção de carboidratos etc. O mecanismo de ação destes agentes, embora alguns sejam empregados há décadas, ainda é controverso.

BIBLIOGRAFIA

Brosnan JT: Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* **133** (6):2068S-2072S, 2003.

Cahill GF Jr: Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* **26**:1-22, 2006.

Cahill GF Jr, Veech RL: Ketoacids? Good medicine? *Trans Am Clin Climatol Assoc* **114**:149-161, 2003.

Carey PE et al: Direct assessment of muscle glycogen storage after mixed meals in normal and type 2 diabetic subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** (4):E688-E694, 2003.

Fukao T et al: Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70** (3):243-251, 2004.

Haffner SM: The importance of hyperglycemia in the nonfasting state to the development of cardiovascular disease. *Endocrine Reviews* **19** (5):583-592, 1998.

Hanson RW: Paths to discovery. *Biochem Molec Biol Ed* **33** (4):243-245, 2005.

Kaplan LA, Pesce AJ e Kazmierczak SC: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, 4th ed. Mosby Inc., 2003.

Morris AA: Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis* **28** (2):109-121, 2005.

Owen OE: Ketone bodies as a fuel for the brain during starvation. *Biochem Molec Biol Ed* **33** (4):246-251, 2005.

Smyth S, Heron A: Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Med* **12** (1):75-80, 2005.

Taylor R et al: Direct assessment of liver glycogen storage by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects. *J Clin Invest* **97**:126-132, 1996.

Valeri C et al: Glucose control in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **20** (Suppl 2):S1-S8, 2004.

Woerle HJ et al: Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** (4):E716-E725, 2003.

Young VR, Scrimshaw NS: The physiology of starvation. *Sci Am* **225** (4):14-21, 1971.

22

Contração Muscular

Nos vertebrados, há três tipos de músculos: esquelético, cardíaco e liso. Os músculos esqueléticos sofrem contração voluntária, desencadeada por impulsos nervosos motores, ao passo que os músculos lisos e cardíaco sofrem contração involuntária. O mecanismo de contração e a organização estrutural dos músculos esqueléticos e do miocárdio são semelhantes; ambos têm aspecto estriado quando observados ao microscópio óptico. Os músculos lisos são assim chamados por não apresentarem o padrão estriado dos outros dois tipos de músculos; distinguem-se, também, por contraírem-se relativamente devagar, mas manterem a tensão por períodos mais longos que os músculos estriados. São encontrados, por exemplo, nas paredes do estômago, útero, intestino e dos vasos sanguíneos. Em um homem adulto, 40% da massa corpórea (cerca de 30 kg) são constituídos por músculos esqueléticos.

22.1 ESTRUTURA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Os músculos esqueléticos são formados por feixes paralelos de numerosas células muito longas, as *fibras musculares*, cuja membrana plasmática é chamada *sarcolema* (*sarkos*, em grego, significa carne). O citoplasma (*sarcoplasma*) destas células contém centenas de filamentos contráteis organizados em paralelo, as *miofibrilas*. As miofibrilas são constituídas por dois tipos principais de filamentos proteicos, *filamentos grossos* e *filamentos finos*, e sua disposição resulta no padrão de bandas de diferentes refringências, que conferem uma aparência estriada à fibra muscular examinada ao microscópio óptico. Ao microscópio eletrônico, é possível visualizar zonas claras e escuras alternadas: as *bandas I* (de *isotrópicas*), contendo somente filamentos finos, e as *bandas A* (de *anisotrópicas*), contendo filamentos grossos e finos parcialmente sobrepostos. No centro da banda I aparece a *linha Z* (ou *disco Z*) e no meio da banda A, a *linha M* (ou *disco M*). A unidade funcional é o *sarcômero*, a região compreendida entre duas linhas Z (Fig. 22.1).

22.1.1 FILAMENTOS GROSSOS: MIOSINA

Os filamentos grossos são constituídos basicamente por *miosina*, uma proteína com seis cadeias polipeptídicas, duas maiores, as *cadeias pesadas*, e quatro menores, as *cadeias leves*, iguais duas a duas. As cadeias organizam-se em uma porção fibrosa, a *cauda da miosina*, e duas porções globulares idênticas, as *cabeças da miosina* (Fig. 22.2). A cauda é um longo bastão em dupla hélice, resultante da associação das duas cadeias pesadas, com estrutura em α-hélice, que se enrolam uma sobre a outra, ao longo de grande extensão da região carboxila terminal. Na extremidade amino terminal da dupla hélice, as cadeias pesadas dobram-se separadamente e cada uma une-se a duas cadeias leves formando as cabeças da miosina. Cada cabeça contém um domínio catalítico e um domínio mecânico (ou regulador). O domínio catalítico contém o centro ativo com atividade ATPásica e o sítio de ligação aos filamentos finos. O domínio mecânico é constituído por um trecho em hélice da cadeia pesada ao qual se entrelaçam as cadeias leves; situa-se entre o domínio catalítico e a cauda da miosina, aos quais se une por ligações flexíveis. Ou seja, o domínio mecânico apresenta dois pontos de articulação, que permitem mudança de sua orientação durante o ciclo de contração muscular, razão pela qual é chamado de "braço-alavanca" (*lever-arm*). Em músculos lisos (Seção 22.6), a fosforilação das cadeias leves é essencial para a contração.

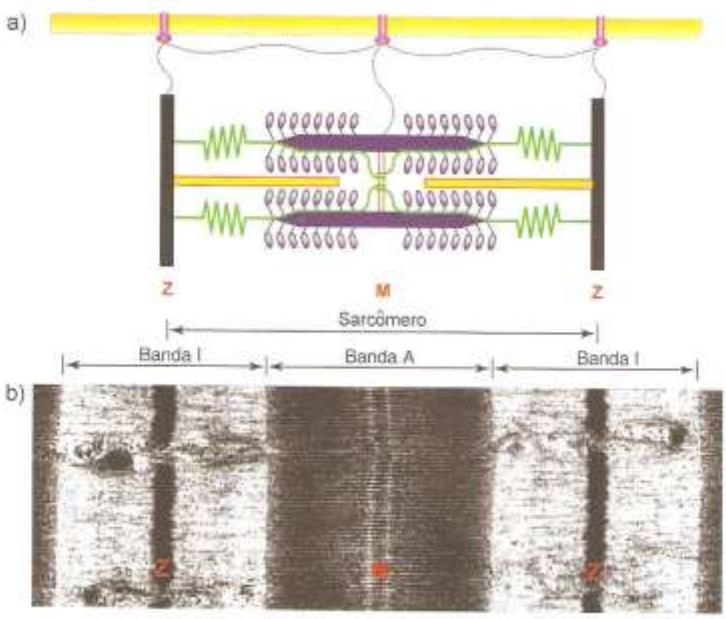


Fig. 22.1 a) Diagrama da estrutura do sarcômero. Os filamentos grossos (azuis) e os finos (amarelos) são organizados em paralelo por duas estruturas transversais, os discos Z (pretos) e M (vermelho). Os discos Z definem os limites do sarcômero e ancoram os filamentos finos; ao disco M, fixam-se os filamentos grossos. Os filamentos verdes (de titina) são flexíveis e conectam os filamentos grossos aos discos Z e M. Os filamentos extra-sarcoméricos (magenta) ligam-se a proteínas integradas do sarcolema. b) Micrografia eletrônica de um segmento de miofibrila em corte longitudinal. As regiões de sarcômeros adjacentes ocupadas somente por filamentos finos aparecem como uma faixa clara, a banda I, em cujo centro localiza-se o disco Z. Os filamentos grossos sobrepostos a uma parte dos filamentos finos formam a zona escura no meio do sarcômero, a banda A, no centro da qual fica o disco M. Reproduzida com modificações de Agarkova e Perriard, 2005.

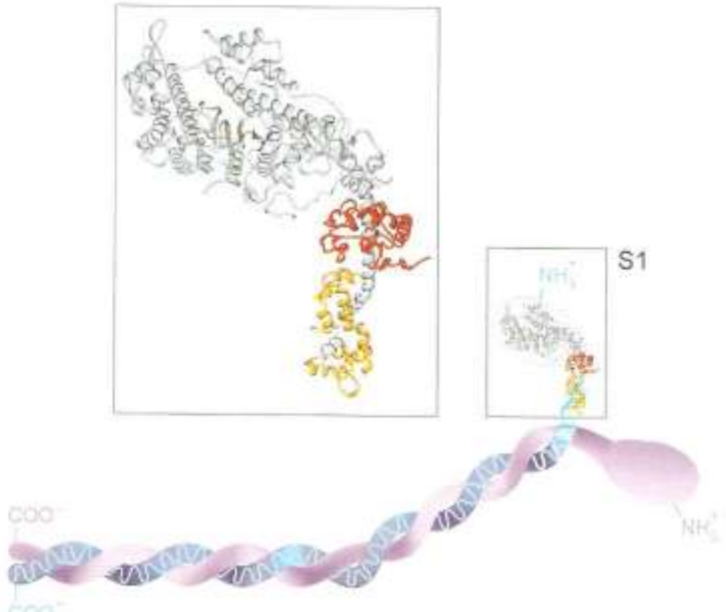


Fig. 22.2 A molécula de miosina apresenta um segmento fibroso, a cauda, e duas porções globulares, as cabeças (S1). A cauda é formada pelo enrolamento das duas cadeias pesadas em α-hélice; estas, na região amino terminal, separam-se e cada uma se une a duas cadeias leves, originando S1. A estrutura tridimensional de S1 está detalhada no retângulo à esquerda. A extremidade esférica resulta do dobramento da cadeia pesada (azul) e corresponde ao domínio catalítico, que inclui o centro ativo e o sítio de ligação aos filamentos finos, com forma de fenda; a porção alongada é formada por um segmento em α-hélice da cadeia pesada ao qual se associam as duas cadeias leves (em amarelo e vermelho) e corresponde ao domínio mecânico (*lever-arm*).

As cabeças da miosina são também chamadas de S1, por corresponderem a um dos fragmentos peptídicos produzidos por digestão parcial da miosina com enzimas proteolíticas, o fragmento S1 (de *subfragment 1*).

Os filamentos grossos são formados por centenas de moléculas de miosina, associadas cauda a cauda (Fig. 22.3). As cabeças ficam orientadas em direções opostas em relação ao centro do sarcômero, onde se encontram somente segmentos lineares, as caudas, que constituem a zona mais clara ao redor da banda M na Fig. 22.1. As cabeças projetam-se a intervalos regulares, podendo ligar-se aos filamentos finos, constituindo as *pontes cruzadas*.



Fig. 22.3 Esquema mostrando a disposição de moléculas de miosina compondo um filamento grosso. Reproduzida de Voet D, Voet JG: *Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., 1995.

22.1.2 FILAMENTOS FINOS: ACTINA, TROPOMIOSINA E TROPONINA

A principal proteína do filamento fino é a *actina*, que pode existir na forma globular ou fibrosa, dependendo da força iônica do meio. Nas condições celulares, os monômeros globulares de actina (*actina G*) polimerizam-se, formando duas hélices, que se entrelaçam originando uma longa molécula, a *actina F* (Fig. 22.4). Cada filamento fino contém uma molécula de actina F associada a duas outras proteínas, a tropomiosina e a troponina. A molécula de *tropomiosina* é um dímero helicoidal, resultante do enrolamento de duas cadeias em α-hélice; ela se insere ao longo do sulco entre as duas hélices da actina F, cobrindo sete monômeros de actina. A união de várias moléculas de tropomiosina origina um filamento que se estende por toda a superfície da actina F. Cada molécula de tropomiosina está unida a uma molécula de troponina. A *troponina* é uma proteína composta de três subunidades: *TnC*, capaz de ligar-se a Ca^{2+}; *TnI*, que inibe a ligação de S1 à actina; e *TnT*, que se liga à tropomiosina.

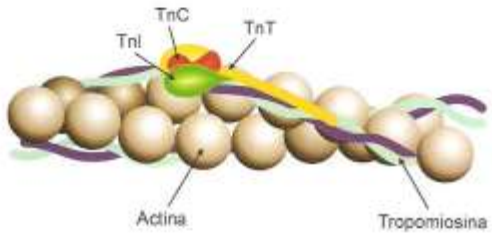


Fig. 22.4 Organização das moléculas de troponina (Tn), tropomiosina (Tm) e actina no filamento fino. As subunidades da troponina, TnC, TnT e TnI, dispõem-se sobre as duas α-hélices da tropomiosina, que cobrem 7 monômeros de actina. TnT é uma molécula assimétrica: a extremidade filamentosa sobrepõe-se à tropomiosina e a esférica interage com TnC e TnI. TnI liga-se também à actina. Reproduzida de Gordon et al, 2000.

22.1.3 PROTEÍNAS SARCOMÉRICAS ACESSÓRIAS

Além das principais proteínas componentes dos filamentos grossos e finos descritas, estão presentes no sarcômero muitas outras proteínas que asseguram a organização estrutural dos filamentos contráteis. Cada uma das duas estruturas transversais, os discos Z e M, é formada por diversas proteínas organizadas em complexos multiproteicos. O disco Z ancora os filamentos finos de sarcômeros adjacentes e o disco M, os filamentos grossos no centro dos sarcômeros. Os discos Z e M são conectados por filamentos longitudinais, que se prendem também aos filamentos grossos, formados por *titina*, uma proteína gigante, com cerca de 30.000 aminoácidos; sua molécula elástica funcionaria como uma mola, garantindo a integridade do sarcômero durante o ciclo de contração/relaxamento. Existem ainda filamentos proteicos externos ao sarcômero, que ligam os discos Z e M ao sarcolema (Fig. 22.1).

O arranjo preciso das proteínas musculares para compor os filamentos e as alterações estruturais que ocorrem durante a contração e o relaxamento do músculo permanecem sob intensa investigação.

22.2 MECANISMO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

A contração de músculos esqueléticos ocorre por encurtamento do sarcômero como resultado do deslizamento dos filamentos finos entre os grossos. O sarcômero é encurtado em até 65%, sem mudança no comprimento dos próprios filamentos.

A movimentação dos filamentos dá-se à custa da energia produzida pela hidrólise de ATP, catalisada pelas cabeças da miosina. Em experimentos *in vitro*, demonstrou-se que miosina, ou mesmo S1, em solução é capaz de hidrolisar ATP, mas ADP e P_i são excluídos do sítio ativo muito lentamente. A adição de actina estimula de 100-200 vezes a atividade ATPásica da miosina (*actin* deriva de *activate*), por aumentar a velocidade da liberação dos produtos, a etapa limitante da reação.

Para que as proteínas motoras produzam movimento, a hidrólise de ATP deve estar acoplada a mudanças de conformação. O mecanismo de transdução da energia química em energia mecânica pelas proteínas musculares é explicado pela hipótese do "braço-alavanca" (*lever-arm*), que postula ser a rotação angular desta estrutura de S1 o componente mecânico primário da geração de força e movimento. De acordo com este modelo, a interação das cabeças da miosina com a actina, o estabelecimento das pontes cruzadas, ocorreria pela seqüência de etapas esquematizadas na Fig. 22.5. Na etapa 1, o ATP liga-se ao complexo actina•miosina, a actomiosina (AM), formando actomiosina•ATP (AM•ATP), que se separa rapidamente (etapa 2) em actina e miosina•ATP (M•ATP). Na etapa 3, o ATP é prontamente hidrolisado na cabeça da miosina, resultando M•ADP•P_i. A dissociação de AM•ATP em A e M•ATP é tão rápida, que a hidrólise ocorre na miosina dissociada. Segue-se a reassociação, todavia por meio de ligações fracas, de actina e M•ADP•P_i, formando A-M•ADP•P_i (etapa 4). Este conjunto sofre isomerização, convertendo-se em um complexo fortemente ligado, AM*•ADP•P_i, apto a liberar os produtos (etapa 5). A liberação de P_i desencadeia a rotação do *lever-arm* e a produção de força para a contração (etapa 6). A liberação de ADP (etapa 7) produz AM, que pode ligar-se a ATP, reiniciando o processo.

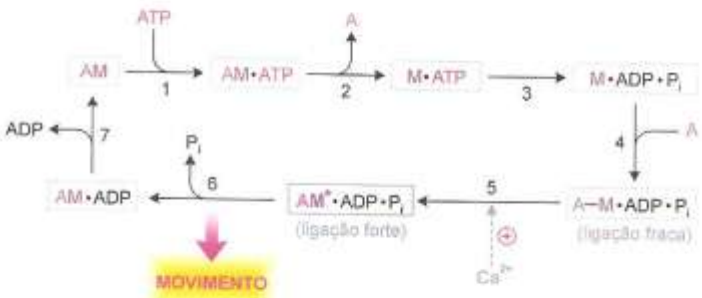


Fig. 22.5 Etapas de interação entre actina (A) e miosina (M) e de geração de força para a contração, propostas pela hipótese do *lever-arm* ("braço-alavanca") para o mecanismo da conversão de energia química em mecânica. Na etapa 6, de liberação de P_i, a energia é utilizada para mudar a posição do *lever-arm*, que desloca a actina. A etapa 5 é estimulada por íons Ca^{2+}. As etapas estão detalhadas no texto.

A principal etapa controlada por íons Ca^{2+} durante a ativação da contração muscular (Seção 22.3) é a transição do complexo fracamente ligado, A-M•ADP•P_i, àquele fortemente associado, AM*•ADP•P_i (etapa 5). A hidrólise de ATP é muito rápida e o passo limitante da formação das pontes cruzadas é a liberação dos produtos. Uma versão alternativa do modelo do *lever-arm* propõe que a transição para um estado com ligações fortes e a liberação de P_i ocorreriam em uma mesma etapa. De qualquer modo, a dissociação de P_i do sistema AM*•ADP•P_i é acompanhada por grande queda de energia livre e corresponde à fase de geração de trabalho mecânico.

O *lever-arm* atuaria como um amplificador de mudanças estruturais discretas de S1, e a velocidade de deslizamento dos filamentos deveria depender de seu tamanho; de fato, demonstrou-se que a extensão do deslocamento sofrido pelo filamento de actina por ciclo de contração é uma função direta do comprimento do *lever-arm*. Uma representação simplificada da movimentação do *lever-arm*, deslocando a actina, está mostrada na Fig. 22.6. O *lever-arm* muda de orientação em relação ao domínio catalítico e à cauda da miosina, enquanto a posição do domínio catalítico não muda significativamente.

Em resumo, o complexo actomiosina é desfeito por ATP (a afinidade da miosina por actina é grandemente reduzida pela ligação de ATP à miosina e esta se desliga da actina) e a propulsão mecânica depende da liberação de fosfato após

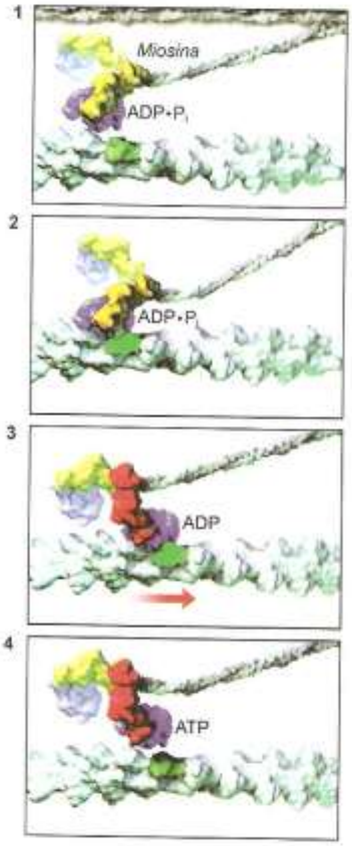


Fig. 22.6 Modelo do deslocamento dos filamentos de actina e miosina de músculos esqueléticos. Uma molécula de miosina ancora-se ao filamento grosso (mostrado no limite superior do Quadro 1) pela cauda, e uma de suas duas cabeças (S1) está próxima do filamento de actina (em cinza-claro, na parte inferior dos quadros). As duas cabeças da miosina atuam independentemente, unindo-se à actina uma por vez. O domínio catalítico de S1 está indicado em azul e o mecânico (*lever-arm*), em amarelo ou vermelho, dependendo do estado em que se encontra. **Quadro 1**: O domínio mecânico está no estado pré-movimento (amarelo) e o domínio catalítico, contendo ADP e P_i, liga-se fracamente à actina (estado correspondente à etapa 4 da Fig. 22.5). **Quadro 2**: S1 liga-se forte e corretamente ao sítio de ligação (verde) na actina, ficando apto a mover-se (etapa 5 da Fig. 22.5). **Quadro 3**: A associação apropriada com a actina causa a liberação de P_i do sítio ativo de S1 (etapa 6 da Fig. 22.5); o *lever-arm* dá uma guinada, deslocando o filamento de actina (seta vermelha) por cerca de 100 Å, passando para o estado pós-movimento (vermelho), com ADP ligado. **Quadro 4**: Completado o movimento, o ADP dissocia-se e o ATP liga-se ao sítio ativo então vazio, causando a separação entre miosina e actina (etapas 7, 1 e 2 da Fig. 22.5). O ATP é rapidamente hidrolisado, o que reverte o domínio catalítico ao estado de ligação fraca à actina (etapas 3 e 4 da Fig. 22.5) e o *lever-arm* à posição pré-movimento, ou seja, o retorno ao Quadro 1. Reproduzida de Vale RD, Milligan RA: *Science* 288 (5463): 88-95, 2000. A animação referente a esta figura pode ser vista em: www.sciencemag.org/feature/data/1049155.shl.

a etapa de hidrólise de ATP: o *lever-arm* sofre uma grande rotação angular e a miosina desloca o filamento de actina. A conclusão surpreendente é que as proteínas motoras são capazes de "sentir" a presença ou a ausência de um único grupo fosfato para mudar de conformação entre os estados com ATP ou ADP ligado. Como a miosina está fortemente ligada à actina somente durante o período de produção de movimento, as cabeças de miosina não podem mover-se continuamente ao longo da actina: cada uma delas repete o ciclo descrito muitas vezes durante um único evento de contração. A contração muscular consiste, portanto, em fixação e desligamento sucessivos das cabeças de miosina à actina, um fazer e desfazer de pontes cruzadas, à custa da energia liberada pela hidrólise de ATP.

O conhecimento disponível sobre a contração muscular no nível molecular baseia-se em estudos com sistemas isolados, *in vitro*. Ainda falta demonstrar que as conclusões obtidas aplicam-se a músculos contraindo em condições fisiológicas, o que é dificultado pela complexidade estrutural das fibras musculares.

22.3 REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

Em músculos esqueléticos, a interação da miosina com a actina e, por conseqüência, a atividade ATPásica de S1 e a contração são moduladas pela atuação conjunta da troponina e da tropomiosina, mediada por íons Ca^{2+}. No músculo em estado de repouso (relaxado), essas proteínas bloqueiam regiões da molécula de actina onde se ancoram as cabeças da miosina — a ATPase de S1 não é ativada e a contração é inibida. O aumento da concentração de Ca^{2+} reverte a inibição: aquelas regiões da actina ficam descobertas, viabilizando a ligação miosina-actina, o que aumenta a atividade ATPásica em cerca de 100 vezes, e a contração é estimulada.

A ligação de íons Ca^{2+} à subunidade TnC da troponina, análoga à calmodulina, determina uma série de mudanças de conformação, alterando as interações entre troponina, tropomiosina e actina e, portanto, a posição dessas proteínas no filamento de actina. A interação entre TnC e TnI torna-se mais forte, a de TnI à actina mais fraca e TnI é removida de seus sítios de fixação à actina; a união entre TnT e tropomiosina fica mais lábil, permitindo que a tropomiosina se desloque sobre a superfície da actina, deixando descobertos os sítios de ligação fraca da miosina à actina, anteriormente bloqueados pela tropomiosina. O resultado é a possibilidade de ligação da miosina à actina, que ativa a ATPase de S1 e causa translocação adicional da tropomiosina sobre a actina, permitindo o estabelecimento de ligações fortes, geradoras de força.

Resumindo, a contração de músculos esqueléticos é inibida pelo complexo troponina-tropomiosina associado à actina; a ocupação de sítios reguladores por Ca^{2+} expõe regiões da actina com as quais a miosina estabelece ligações fortes, a etapa que precede a liberação dos produtos e a produção de força, ativando a contração.

Ca^{2+} é o intermediário entre o impulso nervoso e a contração muscular

A contração de músculos esqueléticos é desencadeada por uma onda de despolarização que se propaga pela membrana das fibras musculares em resposta à chegada do impulso nervoso. A despolarização é transmitida até o interior da fibra muscular, uma vez que o sarcolema apresenta invaginações transversais à superfície da fibra, os *túbulos T*. Justapostas aos túbulos T, encontram-se as cisternas do retículo sarcoplasmático, que respondem à mudança do potencial de membrana com liberação de Ca^{2+} para o sarcoplasma. No músculo em repouso, a concentração de Ca^{2+} no interior do retículo é mantida muito alta (10^{-3} M) em relação à do sarcoplasma (10^{-7} M), graças à ação da Ca^{2+}-ATPase, uma bomba de cálcio movida a ATP, presente na membrana do retículo. A chegada do impulso nervoso torna a membrana do retículo permeável a cálcio, e o vazamento deste íon para o sarcoplasma eleva a sua concentração até 10^{-5} M.

A liberação de Ca^{2+} no sarcoplasma inicia a contração. O Ca^{2+} liga-se a TnC e, pelos mecanismos de regulação descritos, ficam expostos os sítios da actina aos quais as cabeças de miosina, contendo ATP no domínio catalítico, são capazes de ligarem-se. A atividade ATPásica é estimulada e a hidrólise de ATP, acompanhada pela saída de P_i e ADP, provê energia para que as cabeças empurrem o filamento fino, por meio da rotação angular do *lever-arm*. Uma nova molécula de ATP liga-se a S1, provocando a separação entre miosina e actina, começando um novo ciclo de contração. Enquanto isto ocorre, estão sendo formadas pontes cruzadas em outros locais, impedindo que o filamento de actina volte à sua posição original. Assim, os filamentos finos são deslocados em direção ao centro do sarcômero, que diminui de comprimento. Este processo, no qual a energia química é convertida em energia mecânica, leva a uma superposição total dos filamentos finos e grossos, acarretando o encurtamento da fibra muscular.

Cessada a excitação nervosa, os íons cálcio são bombeados de volta para o retículo sarcoplasmático, restabelecendo as concentrações características do estado de repouso. Na falta de cálcio, a troponina não desloca mais a tropomiosina, que passa a impedir novas ligações de miosina à actina; as cabeças de miosina, contendo ATP, desligam-se da actina: instala-se o relaxamento do músculo.

Um decréscimo na concentração de ATP da fibra muscular devido a, por exemplo, consumo excessivo no ciclo de contração/relaxamento ou síntese diminuída na isquemia tem duas conseqüências: a Ca^{2+}-ATPase deixa de manter baixa a concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma e a associação da miosina com a actina é promovida; o desligamento das cabeças de miosina da actina não pode ocorrer, porque não há ATP para ligar-se a S1. O complexo actina-miosina não se desfaz e o relaxamento é impedido, permanecendo o estado de contratura. Esta é a explicação para a condição de *rigor mortis*, a rigidez muscular extrema verificada após a morte.

22.4 FONTES DE ENERGIA PARA O TRABALHO MUSCULAR: PROCESSOS ANAERÓBIOS E AERÓBIOS

A quantidade de ATP disponível em músculos esqueléticos só é capaz de sustentar 1-2 segundos de contração intensa. Um reservatório adicional de energia é constituído por *fosfocreatina*, presente em concentrações 3-5 vezes maiores

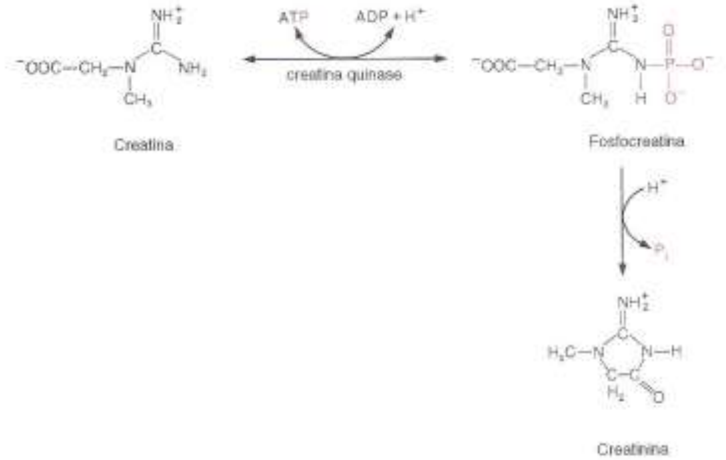


Fig. 22.7 A fosfocreatina resulta da transferência de um grupo fosfato do ATP para a creatina. Durante a contração, a reação processa-se no sentido oposto. A fosfocreatina decompõe-se em creatinina, que é excretada na urina.

do que as de ATP. A fosfocreatina é produzida nos períodos de repouso, por fosforilação de creatina à custa de ATP, catalisada pela creatina quinase (Fig. 22.7). A reação é prontamente reversível e, durante a atividade muscular, processa-se no sentido da regeneração de ATP, para sustentar a contração.

A creatina é sintetizada a partir de arginina, glicina e S-adenosilmetionina. A fosfocreatina, lenta e espontaneamente, é convertida a *creatinina*, que não tem nenhum destino metabólico, sendo liberada na circulação e eliminada na urina. Como a quantidade excretada por dia em um indivíduo hígido é constante, por ser proporcional à massa muscular, a dosagem de creatinina na urina constitui um indicador sensível da função renal.

ATP e fosfocreatina constituem o suprimento imediato de energia para o trabalho muscular, suficiente para esforços máximos e pouco duradouros, de 5-8 segundos. Trata-se de um processo estritamente anaeróbio, fornecendo a maior parte da energia para o desempenho de atividades como: corrida de 100 m rasos, natação por 25 m, levantamento de peso, saque no tênis, salto em altura, chute no futebol etc.

A continuidade do trabalho muscular exigirá energia derivada de outras fontes. O próximo suprimento é a glicose, proveniente da circulação e do glicogênio muscular. No exercício, a entrada de açúcar nas células musculares é promovida pela proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e a degradação de glicogênio é estimulada pela mesma liberação de Ca^{2+} que desencadeia a contração e ainda por epinefrina e AMP, que têm seus níveis aumentados. A glicose 6-fosfato resultante de fosforilação da glicose sangüínea e da degradação do glicogênio é metabolizada pela glicólise, que também está ativada (Seção 20.2), produzindo ATP para sustentar a contração muscular.

A via glicolítica é inicialmente anaeróbia, com produção de lactato e H^+, já que a reserva muscular de oxigênio (associado à mioglobina) é pequena e a oferta de oxigênio pela circulação não aumenta de forma imediata e proporcional à demanda muscular de ATP. De fato, quando um músculo passa do repouso para o exercício intenso, o aporte de oxigênio aumenta 25 vezes, enquanto a quantidade de ATP hidrolisado chega a ser 120 vezes maior. Nenhum outro tecido apresenta variações tão grandes e abruptas no gasto de ATP. A degradação anaeróbia da glicose constitui uma alternativa imediata para a hipóxia relativa no início de um esforço extenuante, mas não pode continuar indefinidamente, sendo capaz de sustentar exercícios intensos com duração de 1-2 minutos. É a fonte principal de energia para corridas de 200, 400 ou 1.000 m rasos, natação de 100-200 m, corridas intermitentes (arrancadas) no futebol etc.

À medida que os sistemas respiratório e circulatório são ativados e o suprimento de oxigênio cresce, a contribuição da glicólise anaeróbia para o fornecimento de energia para a contração vai sendo substituída pela oxidação aeróbia, completa, da glicose. Paralelamente, o fornecimento de ácidos graxos para o sistema muscular aumenta, em virtude da ação da epinefrina sobre o tecido adiposo. A oxidação dos ácidos graxos assume importância crescente, à medida que a duração da atividade física aumenta e a reserva de glicogênio diminui. Acima de 2-3 minutos de esforço vigoroso, o trabalho muscular contínuo é feito, principalmente, à custa de ATP obtido por oxidação aeróbia dos substratos disponíveis (Fig. 22.8). Incluem-se, aqui, as corridas de 1.500 m ou mais, ciclismo e esqui competitivos, maratona etc.

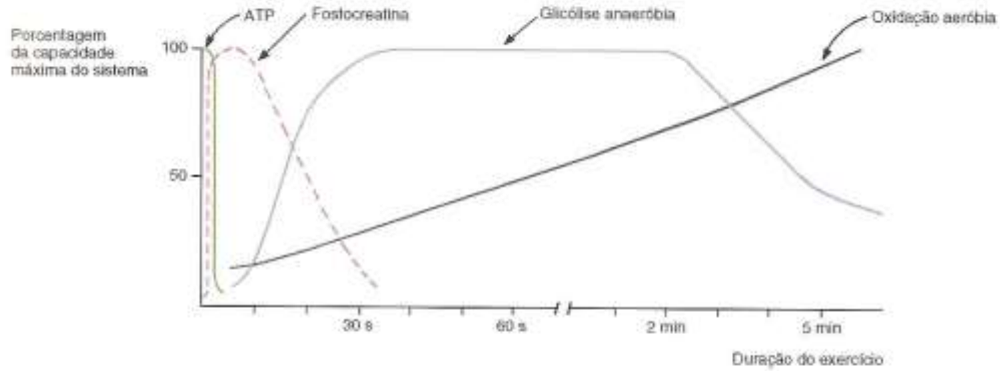


Fig. 22.8 Fontes de energia para o trabalho muscular. O gráfico mostra o desempenho dos sistemas geradores de energia, expresso em porcentagem do total de energia que cada sistema é capaz de produzir, durante exercícios extenuantes. A curva de glicólise anaeróbia refere-se à degradação de glicose a lactato e a de oxidação aeróbia, à oxidação total de glicose e ácidos graxos.

Os processos geradores de ATP têm velocidades diferentes

Como a concentração de ATP nos músculos é pequena, o desempenho físico depende da velocidade dos diferentes processos de obtenção de ATP nas fibras musculares. O processo mais rápido é a fosforilação de ADP pela fosfocreatina (Tabela 22.1); todavia, a quantidade de ATP conseguido assim é limitada pela concentração também pequena de fosfocreatina. A glicólise anaeróbia, apesar de apresentar baixo rendimento (quase 20 vezes menor do que a oxidação aeróbia da glicose), produz ATP com velocidade maior do que as vias aeróbias. A síntese de ATP pela fosforilação oxidativa é mais lenta, especialmente quando decorrente da oxidação de ácidos graxos; por outro lado, o depósito de triacilgliceróis constitui a maior reserva energética do organismo (Tabela 21.2 – Seção 21.1).

Tabela 22.1 Fontes de energia para a contração muscular

Fontes de ATP	Velocidade máxima de produção de ATP ($mmol \cdot s^{-1}$)
Fosfocreatina	73,3
Glicogênio muscular a lactato: glicólise anaeróbia	39,1
Glicogênio muscular a CO_2 e H_2O: oxidação aeróbia	16,7
Ácidos graxos a CO_2 e H_2O: oxidação aeróbia	6,7

A velocidade alcançada durante uma corrida é uma função direta do sistema gerador de energia acionado: ATP-fosfocreatina, glicólise anaeróbia e oxidação aeróbia. A corrida de 100 metros rasos, percorridos em 10 segundos por atletas de elite, utiliza ATP, fosfocreatina e glicólise anaeróbia, ou seja, os processos anaeróbios, os mais velozes (Tabela 22.2). Essas fontes são insuficientes para corridas mais longas, como a de 1.500 metros, e a fosforilação oxidativa é acionada, utilizando o glicogênio muscular, além de uma participação menor da oxidação de ácidos graxos; como a velocidade de produção de ATP dos processos aeróbios é menor, a velocidade da corrida também é menor. Em uma maratona, a contribuição da oxidação de ácidos graxos aumenta muito, resultando uma velocidade de corrida ainda menor. Neste tipo de exercício,

Tabela 22.2 Parâmetros característicos de diferentes corridas atléticas

Distância percorrida (m)	Tempo gasto	Velocidade da corrida ($m \cdot s^{-1}$)
100	10 s	10,0
1.000	2,2 min	7,6
42.200	2 h	5,9

o baixo consumo de glicose e a intensa degradação de ácidos graxos compõem um efeito poupador, de modo a manter a glicemia em níveis próximos do normal até o final da maratona. As alterações da concentração de lactato nos músculos de maratonistas são muito pequenas, evidenciando a baixa ocorrência de metabolismo anaeróbio.

É importante ressaltar que os três sistemas geradores de energia são solicitados na maioria das atividades físicas e o que varia é a contribuição relativa de cada sistema para o total de energia necessária, conforme a *intensidade* e a *duração* do exercício. Atividades de alta intensidade têm de depender da degradação anaeróbia de substratos, porque não há oxigênio suficiente para permitir o metabolismo aeróbio; ainda mais, somente carboidratos podem ser oxidados anaerobiamente. Em outras palavras, a energia para este tipo de exercício é proveniente da degradação anaeróbia de glicose. Por ter baixo rendimento em ATP e velocidade alta, esta via, além de produzir prótons, consome o glicogênio muscular, características estas que restringem a duração de atividades máximas a períodos curtos de tempo. Em exercícios de intensidade moderada, como corrida em baixa velocidade (*jogging*), dança, natação e ciclismo recreacionais etc., cerca de metade da energia origina-se de oxidação aeróbia do glicogênio muscular, e metade, daquela de ácidos graxos. Nas atividades de intensidade de moderada a baixa, como o caminhar, as vias aeróbias são as fontes predominantes de energia, com maior proporção da utilização de ácidos graxos, um processo mais lento. A duração da atividade também determina o substrato a ser consumido: quanto maior o tempo despendido no exercício, maior a contribuição dos ácidos graxos para o fornecimento de ATP. Tendo em vista que ácidos graxos não podem ser oxidados na ausência de carboidratos, a preservação do glicogênio muscular é fundamental para o desempenho satisfatório mesmo em atividades prolongadas.

O metabolismo aeróbio requer um suprimento contínuo e adequado de oxigênio. No instante em que o exercício é iniciado e com o aumento de sua intensidade, a capacidade do sistema cardiovascular de suprir oxigênio suficiente torna-se um fator limitante, fator este que é largamente influenciado pelo grau de condicionamento físico do indivíduo. O treinamento acelera o aporte de oxigênio pelo sistema cardiovascular e faz aumentar o número de mitocôndrias e a concentração de enzimas envolvidas na síntese aeróbia de ATP em determinados tipos de fibras musculares, estimulando a oxidação aeróbia, principalmente de ácidos graxos.

O fornecimento de energia é, portanto, um processo contínuo, em que uma das fontes é acionada antes que a anterior se esgote. Por exemplo, na corrida de 100 m rasos, a glicólise anaeróbia é ativada antes de se exaurir o sistema ATP-fosfocreatina, o que resulta em velocidade menor do que a inicial nos últimos segundos de corrida.

Os íons Ca^{2+} também induzem glicogenólise

Os íons Ca^{2+} liberados em resposta a um estímulo nervoso, além de desencadearem a contração muscular, estimulam a degradação de glicogênio e inibem a sua síntese (Seção 20.1). Estes íons ligam-se à fosforilase quinase, tornando-a ativa e desencadeando a glicogenólise, também induzida por epinefrina. No músculo em repouso, menos de 5% da glicogênio fosforilase é funcional, mas, 0,7 segundo após o início da contração, o percentual de enzima ativa já atinge 50%. O resultado final consiste em um aumento da oferta de substrato para a glicólise e da produção de ATP para sustentar a contração muscular (Fig. 22.9).

A fadiga muscular ainda não é totalmente compreendida

A fadiga muscular é a incapacidade de manter a contração e instala-se após estimulação repetida de um grupo muscular. Em exercícios extenuantes e de curta duração, a fadiga não está relacionada ao esgotamento do glicogênio muscular: nas corridas atléticas de curta distância, apenas 35% do glicogênio dos músculos solicitados é consumido, levando a um aumento de 30 vezes na concentração de lactato intramuscular, em média. Embora seja crença corrente que o lactato produzido é o responsável pela fadiga muscular, cãibra e sensação de dor subseqüentes a exercícios extremos, isto não é verdade. O lactato gerado na glicólise anaeróbia durante o exercício intenso difunde-se rapidamente dos músculos para a corrente sanguínea, sendo absorvido pelo fígado. A concentração de lactato intramuscular volta ao nível basal muito antes (queda de cerca de 80%, 30 min após o exercício) que se instale a dor característica na musculatura exercitada em demasia. Acredita-se que a falência da atividade muscular seja devida à grande produção de H^+, que acompanha a de lactato, no interior das fibras musculares. Após contração exaustiva, o pH de um músculo pode passar do valor de 7,1, no repouso, para 6,3. Ainda mais, se o músculo é submetido à perfusão com altas concentrações de lactato, mas o pH é mantido em 7,1, não ocorre fadiga. Diversas hipóteses têm sido aventadas para explicar os efeitos do aumento da concentração intracelular de prótons: inibição da fosfofrutoquinase 1, alteração da transferência de Ca^{2+} entre o sarcoplasma e o retículo, inibição da atividade ATPásica da miosina ou transmissão inadequada do impulso nervoso pelos túbulos T. A

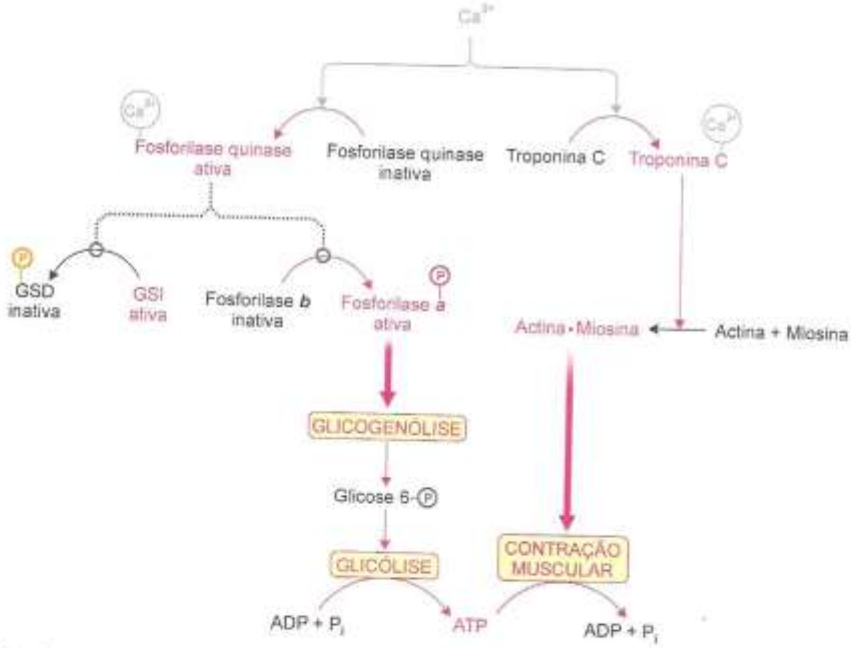


Fig. 22.9 Atuação dos íons Ca^{2+} sobre dois aspectos da contração de músculos esqueléticos: o mecânico, promovido por hidrólise de ATP, e o fornecimento de glicose, de cuja oxidação resulta a síntese de ATP.

condição de *acidose lática* — níveis elevados de lactato e H^+ no sangue, cujo pH pode ficar abaixo de 7,25 — raramente decorre da prática de exercícios; mesmo durante atividades extremas, o aumento dos níveis sanguíneos de lactato e H^+ no sangue costuma ser moderado, não ocasionando diminuição significativa do pH plasmático abaixo do intervalo normal de 7,35-7,45.

Um procedimento que visa tamponar os prótons produzidos durante o exercício é a ingestão prévia de bicarbonato de sódio. Esta prática parece funcionar para atividades como a corrida de 1.000 m, que duram um tempo suficientemente longo para que os H^+ sejam drenados dos músculos para a circulação; não traz nenhum benefício para a corrida de 100 m, porque os prótons produzidos permanecem nos músculos durante esta atividade; também não contribui para a corrida de longa distância, quando as concentrações de lactato e H^+ aumentam muito pouco, já que a maior parte da energia é obtida a partir do metabolismo aeróbio. Um dos problemas associados com a tomada de bicarbonato é a ocorrência de cólicas intestinais e diarréia.

Nos maratonistas, a fadiga instala-se quando há depleção dos estoques de glicogênio; na falta de carboidratos, a oxidação de ácidos graxos fica impossibilitada.

As suplementações nutricionais não otimizam o desempenho físico

A ingestão aumentada de suplementos nutricionais (aminoácidos, carnitina etc.), ao contrário do que se imagina, *não* contribui significativamente para aprimorar o desempenho físico. Os fatores decisivos são patrimônio genético, treinamento e adequação psicológica. Mesmo para a musculação (a prática de exercícios de força para hipertrofia da massa muscular), uma dieta balanceada contendo 10-15% de proteínas de alta qualidade, as de origem animal, fornece a quantidade necessária de aminoácidos. Quanto aos efeitos benéficos da ingestão aumentada de carboidratos ou de lipídios sobre a performance atlética, os resultados obtidos são contraditórios. Naturalmente, quando a atividade física é intensa e prolongada, torna-se necessário um aumento da ingestão calórica: por exemplo, um nadador adulto, que pratica 4-5 h por dia, chega a consumir 6.000 kcal/dia. As calorias adicionais devem ser provenientes de carboidratos e lipídios, obedecendo às mesmas proporções recomendadas para a população não-atlética (Seção 18.2.2). Outro fator a ser considerado no exercício prolongado é a perda de água e eletrólitos pela transpiração, que devem ser repostos adequadamente.

22.5 TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

Os músculos esqueléticos dos vertebrados são compostos por dois tipos principais de fibras: tipo I, as fibras lentas oxidativas, e tipo II, as fibras rápidas, que são subdivididas nos tipos IIa ou rápidas oxidativas-glicolíticas e IIb ou rápidas glicolíticas.

As *fibras tipo I* ou *lentas oxidativas* exibem cor vermelho-escuro devido à grande vascularização e ao alto conteúdo de mioglobina e citocromos, já que são especialmente ricas em mitocôndrias, além de terem diâmetros relativamente menores que maximizam a difusão do oxigênio até as mitocôndrias no interior da célula; naturalmente, têm alta capacidade de oxidar aerobiamente carboidratos e ácidos graxos para gerar ATP. As *fibras tipo IIb* ou *rápidas glicolíticas* são mais claras por serem praticamente destituídas de mioglobina e conterem poucas mitocôndrias; obtêm energia quase exclusivamente por glicólise anaeróbia, usando, então, apenas glicose e glicogênio, e têm diâmetro maior. Como a velocidade de produção de ATP por processos aeróbios é bem menor do que a velocidade das vias anaeróbias e a reserva de substratos para a oxidação aeróbia é maior, as fibras tipo I têm contração mais lenta e mais prolongada e sofrem fadiga mais lentamente do que as do tipo IIb, que são de movimento mais potente e mais rápido, mas descontinuado, e entram em fadiga rapidamente. As *fibras tipo IIa* exibem um perfil contrátil, metabólico e morfológico intermediário entre os outros dois tipos de fibras: velocidade de contração mais ou menos rápida, ambas as capacidades metabólicas, aeróbia e glicolítica, e quantidade mediana de mitocôndrias. O tipo de fibra muscular é determinado primariamente pela isoforma[1] da *cadeia pesada da miosina* (*MHC*, de *myosin heavy chain*) que é sintetizada. As fibras tipo I expressam a isoforma MHC-1, com a maior atividade ATPásica, enquanto o tipo IIb apresenta a isoforma MHC-IIx, que tem a menor capacidade de hidrolisar ATP; o tipo IIa contém MHC-IIa, de atividade intermediária.

As fibras lentas são encontradas em grande número em músculos importantes para atividades duradouras, como a manutenção da postura; um exemplo são os músculos das costas que sustentam a coluna vertebral. As fibras rápidas IIb predominam em músculos que movem pernas e braços e as fibras IIa, oxidativas-glicolíticas, estão presentes em muitos músculos. A maioria dos músculos contém uma mistura dos três tipos de fibras, que provê atividade rápida ou sustentada, conforme mude a demanda. O mesmo músculo apresenta composição variada em diferentes espécies animais, dependendo do modo de sua utilização. Os músculos do vôo de aves migradoras, como patos e marrecos, que desempenham movimentos contínuos e prolongados, são constituídos principalmente por fibras lentas, que atribuem à carne do peito uma cor escura. Em aves terrestres, como galinha e peru, os mesmos músculos, utilizados apenas para movimentos breves e rápidos, são ricos em fibras rápidas e a carne do peito é clara. Em contraposição, nos músculos das pernas destas aves a distribuição é oposta: as migradoras têm fibras rápidas e as terrestres, fibras lentas.

Os músculos esqueléticos humanos são músculos mistos, que expressam os três tipos principais de fibras, em proporções variáveis. Na realidade, admite-se que as fibras não existam em três formas discretas, mas sim como uma gradação de tipos, resultantes de combinações de isoformas das cadeias leves e pesadas da miosina, enzimas do metabolismo energético, proteínas ligantes de cálcio ou de variação do número de mitocôndrias, tamanho da célula etc. A maleabilidade estrutural e funcional das fibras musculares permite adaptação à solicitação que é imposta ao músculo ou a mudanças do ambiente (hipóxia, estresse térmico). O potencial notável que os músculos esqueléticos têm de alterar o seu fenótipo parece ser devido, primariamente, à modulação da expressão gênica de isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC). Enquanto a maioria das fibras musculares expressa uma única isoforma de MHC, em cerca de 30% delas demonstrou-se a co-expressão de isoformas, resultando em fibras híbridas que continham combinações de isoformas de MHC, tais como I/IIa e IIa/IIb.

O treinamento físico é o principal estímulo indutor de transformação do fenótipo muscular. A adaptação mais evidente ao treinamento de força é a hipertrofia muscular, conseqüente ao aumento do tamanho individual das fibras, embora a hiperplasia também possa ocorrer. A questão, discutida há muito tempo e ainda não totalmente resolvida, é se o exercício pode transformar um tipo de fibra em outro, ou seja, modificar a proporção dos diferentes tipos de fibra de um músculo ou se ela é determinada por hereditariedade. No presente, é amplamente aceito que o exercício induz alterações no perfil de isoformas de MHC e, portanto, na percentagem dos tipos de fibra dos músculos exercitados: foram demonstradas mudanças na população de fibras rápidas — conversão do tipo IIb em IIa — e, em menor extensão, mudanças de fibras rápidas para lentas — conversão dos tipos II no tipo I —, levando a um aumento da capacidade oxidativa do músculo. Todavia, o quanto esses desvios são devidos à predisposição genética ou ao treinamento permanece controverso.

---

[1]Isoformas são um tipo particular de isoenzimas, resultantes de modificações pós-tradução (clivagem proteolítica, modificação covalente de aminoácidos etc.).

A distribuição de fibras lentas e rápidas em músculos esqueléticos de atletas praticantes de diversas modalidades esportivas ilustra com clareza a correlação entre a natureza do trabalho muscular (duração, velocidade e força da contração) e o tipo de fibra prevalecente (Tabela 22.3). Os exemplos extremos são os músculos de corredores olímpicos de longa distância (maratonistas), com predominância de fibras lentas (60-90% de fibras tipo I), e os de corredores de curta distância (*sprinters*) ou de fisiculturistas, ricos em fibras rápidas (60-70% dos tipos IIa e IIb). Um outro dado ilustrativo é o conteúdo de isoformas rápidas de MHC (IIa + IIx) do músculo *vastus lateralis*[3] de *sprinters* e fisiculturistas, que chega a 69 e 61%, respectivamente.

Tabela 22.3 Distribuição de fibras rápidas (tipo I) e lentas (tipo II) em atletas de algumas modalidades esportivas

	Porcentagem de fibras[1]	
	Rápidas	Lentas
Maratonistas	18	82
Nadadores	26	74
Atletas de jogos esportivos[2]	55	45
Halterofilistas	55	45
Corredores (curta distância)	63	37
Saltadores	63	37

[1]Determinada nos músculos das pernas (*gastrocnemius* e *vastus lateralis*).
[2]Futebol, vôlei, basquete, handebol.

A atividade física *regular* induz adaptações fisiológicas importantes

A prática sistemática, mas não a esporádica, de exercícios moderados produz uma série de ajustes favoráveis à saúde e ao bem-estar da população não-atlética. Primariamente, melhora a capacidade cardiorrespiratória, isto é, aumenta o débito cardíaco (volume de sangue bombeado por minuto), que propicia um fluxo sanguíneo mais eficiente, e a capacidade respiratória (maior eficiência da troca gasosa, por fortalecimento da musculatura torácica). A vascularização muscular aumenta, permitindo maior captação de oxigênio pelas fibras musculares. Nas hemácias, cresce a concentração de 2,3-bisfosfoglicerato, que diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, facilitando sua liberação nos tecidos. Há aumento da síntese das enzimas musculares responsáveis por vias aeróbias degradativas, como as da β-oxidação e do ciclo de Krebs, e o depósito de glicogênio torna-se maior. O conjunto destas adaptações melhora a capacidade de oxidação aeróbia de substratos, principalmente ácidos graxos, contribuindo para a redução do peso corpóreo. A prática regular do exercício resulta em efeitos benéficos, não só para indivíduos obesos, como para portadores de diabetes, doenças cardiovasculares etc.

22.6 MÚSCULOS LISOS

Os músculos lisos consistem em células alongadas, contendo filamentos grossos e finos, que não se organizam em miofibrilas e cujos sarcômeros não ficam alinhados como nos músculos esqueléticos e cardíaco. Os filamentos finos contêm actina e tropomiosina, mas não troponina. Os filamentos grossos apresentam uma isoforma de miosina, diferente daquelas encontradas nos outros dois tipos de músculos.

Ca^{2+} e cAMP regulam a contração de músculos lisos

A miosina de músculos lisos apresenta, em relação à dos músculos esqueléticos, atividade ATPásica cerca de 10 vezes menor; é regulada por Ca^{2+} e por modificação covalente.

A contração de músculos lisos inicia-se com o aumento da concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma. Nos músculos lisos, o retículo sarcoplasmático é rudimentar e o Ca^{2+} tem origem extracelular. Ele entra nas células através de canais presentes no sarcolema, que podem ser abertos por estimulação elétrica, provocada pelo sistema

[3]O músculo *vastus lateralis* é um dos componentes do grupo muscular denominado *quadriceps femoris*, localizado na porção anterior da coxa.

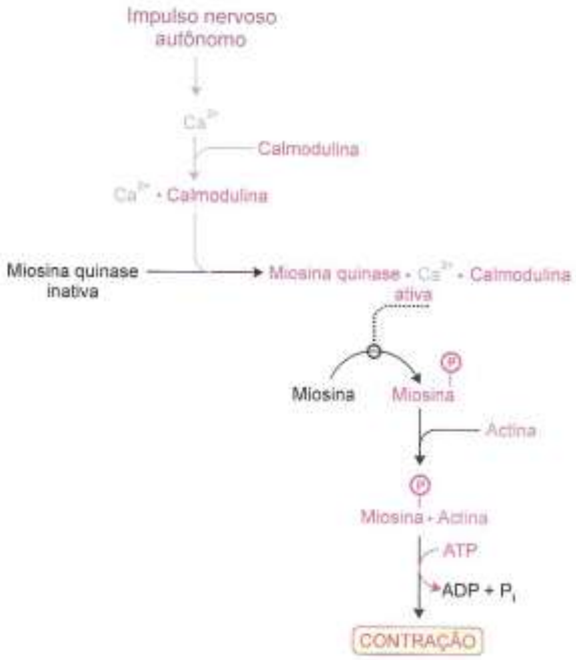


Fig. 22.10 A contração de músculos lisos é desencadeada por cálcio, cuja concentração sarcoplasmática aumenta sob estímulo nervoso autônomo: a miosina quinase liga-se ao complexo Ca^{2+} · calmodulina e catalisa a fosforilação das cadeias leves da miosina, que pode, então, interagir com a actina, provocando a contração muscular.

nervoso autônomo, ou hormonal. Quando isto acontece, o Ca^{2+} associa-se à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} · calmodulina, que se liga a uma *quinase das cadeias leves da miosina* (*MLCK*, de ***myosin light chain kinase***), aqui referida como *miosina quinase*, que é ativada; a enzima é estritamente dependente do complexo e presente em grandes quantidades. Com a fosforilação das cadeias leves pela miosina quinase, as moléculas de miosina mudam de forma, passando de helicoidais a filamentosas, e a interação da miosina com a actina torna-se possível. Quando desfosforiladas, as cadeias leves bloqueiam os sítios da actina aos quais se liga a miosina, impedindo a ligação entre elas, desempenhando o mesmo papel que a subunidade TnI da troponina dos músculos esqueléticos, e o músculo permanece em estado de relaxamento. As cadeias leves, uma vez fosforiladas, deixam descobertos os sítios da actina, permitindo a interação miosina-actina: a ATPase da cabeça da miosina é ativada e a contração ocorre (Fig. 22.10).

Os níveis basais de cálcio são restabelecidos pela exportação do íon, promovida por uma Ca^{2+}-ATPase do sarcolema; o Ca^{2+} dissocia-se da calmodulina, não havendo mais complexo Ca^{2+} · calmodulina para ativar a miosina quinase; uma fosfatase específica remove os gupos fosfato das cadeias leves, que voltam a inibir a ligação da miosina à actina e a atividade ATPásica; na presença de ATP, as pontes cruzadas são desfeitas e o músculo relaxa.

A contração do músculo liso é, portanto, desencadeada por Ca^{2+}, como acontece com o músculo esquelético, mas o mecanismo de ação deste íon difere nos dois tipos de músculos. Nos músculos lisos, a contração é iniciada por fosforilação das cadeias leves, dependente de Ca^{2+} · calmodulina; em músculos esqueléticos e cardíaco, miosina quinase e calmodulina ocorrem em concentrações muito baixas, e o Ca^{2+} determina a contração por ligação com a troponina C. A troponina C pode ser considerada uma forma especializada de calmodulina, a qual, por já fazer parte dos filamentos finos, permite um estímulo mais rápido da contração.

A contração de músculos lisos também é sujeita a controle hormonal. A epinefrina liga-se a receptores β presentes nas células musculares lisas, induzindo estímulo da adenilato ciclase, aumento da concentração de cAMP e ativação da proteína quinase dependente de cAMP (PKA). Um dos substratos da PKA é a miosina quinase, que, quando fosforilada, tem afinidade muito menor por Ca^{2+} · calmodulina, permanecendo, portanto, inativa (Fig. 22.11). A fosforilação das cadeias leves da miosina é interrompida e, conseqüentemente, a contração, resultando o relaxamento dos músculos lisos.

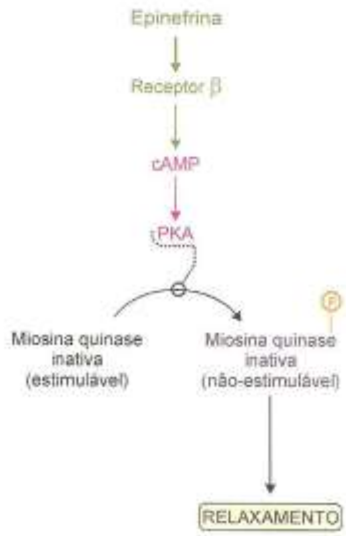


Fig. 22.11 A contração de músculos lisos é inibida por epinefrina: a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) fosforila a miosina quinase, que não pode mais ser estimulada pelo complexo Ca^{2+} · calmodulina e permanece inativa. As cadeias leves da miosina não são fosforiladas e os músculos lisos relaxam.

A inativação da miosina quinase de músculos lisos provocada por epinefrina via receptores β tem ampla aplicação médica. Um exemplo é o tratamento de distúrbios respiratórios, como a *asma*, caracterizados por contração da musculatura lisa dos brônquios, levando à sua constrição e, portanto, à dispnéia. Este distúrbio é controlado pela administração de aerossóis contendo agonistas β-adrenérgicos, que, por determinarem o relaxamento da musculatura brônquica, atuam como agentes broncodilatadores. O relaxamento de músculos lisos também é o princípio farmacológico da *nitroglicerina*, utilizada como vasodilatador coronariano na terapia da *angina*, a dor intensa provocada por isquemia do miocárdio. O real agente mediador do relaxamento das fibras musculares lisas da parede dos vasos é o óxido nítrico, um produto do metabolismo da nitroglicerina.

O *óxido nítrico (NO)* é um radical livre gasoso, com meia-vida de poucos segundos, que atua como mensageiro em vias de transdução de sinal de células de vertebrados e de muitos outros organismos. Apesar de ter sido descrito no final da década de 1980, só recentemente foram identificadas as suas diversas atividades fisiológicas, das quais se destaca a regulação do tônus dos vasos sanguíneos. É sintetizado a partir de arginina no endotélio vascular, em músculos lisos e cardíaco, no sistema nervoso central etc. No caso das células endoteliais, o NO produzido difunde-se até as fibras musculares lisas da parede dos vasos, promovendo o relaxamento muscular e agindo como vasodilatador potente. O mecanismo básico da hipotensão arterial e do estado de choque, freqüentemente observados na septicemia, é a indução da síntese de NO provocada por toxinas bacterianas. Recentemente, demonstrou-se que a hemoglobina exerce uma função adicional àquelas já descritas: o transporte de NO. O óxido nítrico, ao ser transportado e liberado pela hemoglobina na circulação periférica, causa vasodilatação, facilitando a transferência de gases entre as células teciduais e o sangue.

BIBLIOGRAFIA

Agarkova I, Perriard JC: The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* **15** (9): 477-485, 2005.

Arkinstall MJ: Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity. *J Appl Physiol* **97** (6): 2275-2283, 2004.

Barnes PJ: Drugs for asthma. *Br J Pharmacol* **147** (1): S297-S303, 2006.

Brown GA: Teaching skeletal muscle adaptations to aerobic exercise using an American Physiological Society classic paper by Dr. Philip Gollnick and colleagues. *Advan Physiol Educ* **30** (3): 113-118, 2006.

Clark KA et al: Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 637-706, 2002.

Contração muscular — Animação: http://www.lionden.com/muscle_animations.htm.